Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Caracterização genotípica de cepas da família
Enterobacteriaceae produtoras de β -lactamases de
espectro estendido, isoladas de pacientes de um
hospital da rede pública da cidade de São Paulo**

Milena Dropa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de concentração: Serviços de Saúde Pública.

Orientadora: Prof^ª Associada Maria Helena Matté

São Paulo

2006

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Caracterização genotípica de cepas da família
Enterobacteriaceae produtoras de β -lactamases de
espectro estendido, isoladas de pacientes de um
hospital da rede pública da cidade de São Paulo**

Milena Dropa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de concentração: Serviços de Saúde Pública.

Orientadora: Prof^ª Associada Maria Helena Matté

São Paulo

2006

É expressamente proibida a comercialização deste documento tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

Dedicatória

À minha família, Paizinho, Mãezinha, Mô, Nina e Frê, sem vocês não teria chegado até aqui.

Agradecimentos

A Deus, por toda a proteção e luz em meu caminho.

Aos meus pais, pelo amor, pela proteção, e por sempre acreditarem que não perdemos o que investimos em conhecimento.

Às minhas irmãs, Mônica e Marina... *“One who has a sister will never be left alone in life”*, e ao Fred, meu irmão de coração, obrigada por tudo, amo vocês!

À toda minha família, por sempre acreditar que eu posso e consigo;

À Tia Rose, por me acolher no início dessa jornada no “planeta São Paulo”, por todo o amor, dedicação e arroz com feijão!

À Professora Maria Helena Matté, por apostar neste trabalho, pela confiança, amizade e carinho, obrigada, “Mamuska”!

Ao Professor Glavur Rogério Matté, pelo incentivo e pela aposta em minha carreira.

À equipe da CCIH do HU-USP, em especial ao Dr. Fábio Franco, pelo convite, e à Dra. Valéria Cassettari Chiaratto, por todo o suporte e sugestões durante a realização deste trabalho.

À Professora Elsa Masae Mamizuka e ao Dr. Nilton Lincopan, da

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelos ensinamentos, dicas e material que enriqueceram esta pesquisa.

À equipe do Laboratório de Microbiologia Clínica do HU-USP, especialmente à Stella, Angélica, Fátima, Neide e Henriqueta, obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e pela amizade.

Às alunas de aprimoramento do Laboratório de Prática de Saúde Pública da FSP-USP, Martha, Livia e Lícia, que acompanharam e contribuíram para que o trabalho fosse realizado.

Ao Centro Colaborador em Vigilância Sanitária (CECOVISA), pelo patrocínio deste projeto.

Aos meus amigos...

...Rosinha, pelo “empurrãozinho” na hora de decidir entrar nesta batalha;

...Tiago, pela amizade, carinho e “conversas farmacêuticas”;

...Fernanda, pelo “empurrãozinho”, pelas conversas, pelas gargalhadas, pelas lágrimas, enfim, por tudo que aprendemos juntas nos últimos anos;

...Shamyr, pelo apoio e amizade nestes quase três anos de coleguismo;

...Vandréa, por sempre fazer de todos os momentos uma alegria, uma festa, e por todos os papos nas madrugadas e no café da manhã;

...Martha (Marthuxa), por sempre saber ouvir, entender e respeitar, pela confiança e dedicação, pelo carinho, e por todos os momentos alegres e tristes que compartilhamos e nos fizeram fortes;

...Solange, pela amizade e confiança nestes anos todos de FSP;

...Viraneide, especialmente por estar sempre perto, mesmo que tão longe;

...Regina e Celita, pelo orgulho que sentem por eu ter chegado até aqui;

...Ronalda, por ser companheira e amiga, e pelas divertidas “conversas de copa”;

...Livia (Pixunguinha), pela ajuda essencial no laboratório durante este trabalho, e pela amizade tão sincera e divertida;

...José Eduardo (Maestro), que já tendo passado por tudo isso, me entende e incentiva muito. Obrigada por ter se tornado este amigo especial.

...Ao King, pelo companheirismo e fidelidade, e por toda a alegria que trouxe à minha vida;

...Ao Sérgio e à Luna, pelas caminhadas, conversas, apoio e carinho durante esta jornada;

...e a todos os amigos que de alguma forma, em algum momento, me trouxeram momentos felizes.

Muito Obrigada!

- 2000 A.C. – Agora, coma esta raiz*
- 1000 D.C. – Aquela raiz é pagã. Agora, diga esta oração.*
 - 1850 D.C. – Aquela oração é superstição. Agora, beba esta poção.*
 - 1920 D.C. – Aquela poção é óleo de serpente. Agora, tome esta pílula.*
 - 1945 D.C. – Aquela pílula é ineficaz. Agora, leve esta penicilina.*
 - 1955 D.C. – "Oops"... os micróbios mudaram. Agora, leve este tetraciclina.*
 - 1960-1999 – 39 mais "oops" ... Agora, leve este antibiótico mais poderoso.*
 - 2000 D.C. – Os bichos ganharam! Agora, coma esta raiz...*

Anônimo

"A resistência antibiótica é um fenômeno, em si mesmo, não surpreendente. Nem é novo. Porém, está preocupando porque recentemente está se acumulando em grande velocidade, enquanto as ferramentas do mundo para o seu controle diminuem em poder e número."

Joshua Lederberg, vencedor do Prêmio Nobel

RESUMO

Dropa M. Caracterização genotípica de cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2006.

Introdução - A crescente resistência antimicrobiana em bactérias responsáveis por infecções hospitalares é um grande desafio à Saúde Pública. As β -lactamases de espectro estendido (ESBL), que hidrolisam a maioria dos compostos β -lactâmicos, são reconhecidas mundialmente como um grande problema para pacientes hospitalizados, devido à localização de seus genes em elementos transferíveis, facilitando sua disseminação. **Objetivo** - Caracterizar geneticamente cepas de Enterobactérias produtoras de ESBL isoladas de pacientes de um hospital público da cidade de São Paulo. **Material e Métodos** - Todas as cepas de enterobactérias produtoras de ESBL isoladas em um ano foram submetidas a análises moleculares pela PCR, com iniciadores específicos para oito genes *bla*, e as cepas de *Klebsiella pneumoniae* ESBL positivas (ESBL-*Kp*) identificadas nesse período foram comparadas pela técnica de PFGE. **Resultados** - Os genes, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{PER-2}, *bla*_{VEB} and *bla*_{GES} foram identificados em 9 espécies: *Klebsiella pneumoniae* (71,5%), *Escherichia coli* (13,5%), *Morganella morganii* (6%), *Proteus mirabilis* (3%), *Klebsiella oxytoca* (1,5%), *Providencia rettgeri* (1,5%), *Providencia stuartii* (1,5%), *Enterobacter aerogenes* (0,75%) and *Enterobacter cloacae* (0,75%). Os genes *bla*_{PER-1} e *bla*_{OXA} não foram detectados. O PFGE revelou 8 perfis moleculares principais em 68,4% das ESBL-*Kp*, e 31,6% das cepas não estavam relacionadas. **Conclusões** – Os resultados de PCR revelaram uma grande variedade de grupos de ESBL, e aparentemente este é o primeiro relato de grupos GES e VEB em enterobactérias no Brasil. Os resultados sugerem a disseminação de genes de resistência em cepas diferentes de ESBL-*Kp* em alguns setores do hospital, e que alguns clones fortemente relacionados colonizaram pacientes do Berçário por 3 meses.

Descritores: Saúde Pública; Vigilância Sanitária; Infecção Hospitalar; Resistência a antimicrobianos; β -lactamases de espectro estendido (ESBL); Reação em Cadeia de Polimerase (PCR); Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).

ABSTRACT

Dropa M. Genotypic characterization of Extended-Spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains, isolated from patients of a public hospital in the city of São Paulo [dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2006.

Introduction - The increasing antimicrobial resistance in pathogenic bacteria causing nosocomial infections is a major public health challenge. The extended-spectrum β -lactamases (ESBL), which hydrolyze most of β -lactams, are recognized worldwide as a great problem to hospitalized patients, due to the transferable location of their genes, which facilitates their spreading. **Objective** - Genetically characterize ESBL-producing *Enterobacteriaceae* strains isolated from patients of a Public Hospital in the city of São Paulo. **Material and Methods** - All *Enterobacteriaceae* ESBL-producing strains isolated in an 1-year period were submitted to molecular analysis by PCR with specific primers for eight *bla* genes, and all ESBL *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-*Kp*) identified in this period were compared by the PFGE technique. **Results** - Genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{PER-2}, *bla*_{VEB} and *bla*_{GES} were identified in 9 species: *Klebsiella pneumoniae* (71,5%), *Escherichia coli* (13,5%), *Morganella morganii* (6%), *Proteus mirabilis* (3%), *Klebsiella oxytoca* (1,5%), *Providencia rettgeri* (1,5%), *Providencia stuartii* (1,5%), *Enterobacter aerogenes* (0,75%) and *Enterobacter cloacae* (0,75%). Genes *bla*_{PER-1} and *bla*_{OXA} were not detected in any strain. PFGE revealed 8 distinct main molecular patterns in 68,4% of ESBL-*Kp*, and 31,6% of the strains were totally unrelated. **Conclusions** - PCR results showed a great variety of ESBL groups in the institution, and apparently this is the first report of GES- and VEB-ESBL groups in enterobacteria in Brazil. The results suggest the spread of resistance genes in different strains of ESBL-*Kp* in some hospital wards, and also that some strongly related clones of these bacteria colonized patients from a neonatal ward in a 3-month period.

Descriptors: Public Health; Sanitary Surveillance; Nosocomial Infection; Antimicrobial Infection; Extended-Spectrum β -lactamases (ESBL); Polymerase Chain Reaction (PCR); Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações Gerais.....	1
1.1.1. <i>Infecção Hospitalar</i>	1
1.1.2. <i>Resistência a Antimicrobianos</i>	5
1.1.3. <i>Antimicrobianos β-Lactâmicos</i>	11
1.1.4. <i>Enzimas β-Lactamases</i>	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1. Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL).....	21
2.1.1. <i>Definição e Histórico</i>	21
2.1.2. <i>Principais espécies produtoras de ESBL</i>	22
2.1.3. <i>Classificação</i>	24
2.1.4. <i>Hidrólise de Antimicrobianos</i>	33
2.1.5. <i>Deteção e Identificação</i>	35
2.2. ESBL e Infecção Hospitalar.....	36
2.3. Colonizações, Surto e Infecções.....	37
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. Objetivo Geral.....	42
3.2. Objetivos Específicos.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1. Cepas Bacterianas.....	43
4.2. Determinação da Produção de ESBL.....	44
4.3. Extração de DNA total.....	45
4.4. Identificação dos grupos de ESBL pela Reação em Cadeia de Polimerase.....	46
4.5. Comparação genética entre as cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).....	49
4.5.1. <i>Preparo do Plug</i>	49
4.5.2. <i>Extração de DNA Genômico</i>	50
4.5.3. <i>Digestão Enzimática</i>	50
4.5.4. <i>Eletroforese em Campo Pulsado</i>	51
4.5.5. <i>Visualização</i>	51

4.6. Análise dos Resultados.....	52
4.6.1. <i>PCR</i>	52
4.6.2. <i>PFGE</i>	52
5. RESULTADOS.....	53
5.1. Cepas Bacterianas.....	53
5.2. Identificação dos Grupos de ESBL pela PCR.....	55
5.3. Comparação Genética entre as cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> por PFGE.....	59
6. DISCUSSÃO.....	71
6.1. Espécies produtoras de ESBL.....	71
6.2. Determinação dos Grupos de ESBL pela PCR.....	72
6.3. Análise dos Perfis Moleculares de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	76
7. CONCLUSÕES.....	84
8. BIBLIOGRAFIA.....	85

Lista de Quadros

Quadro 1 - Principais Grupos de Antimicrobianos.....	10
Quadro 2 - Principais grupos de β -lactâmicos.....	12
Quadro 3 - Esquema de Classificação para β -lactamases.....	19
Quadro 4 – Sequência de iniciadores para a detecção dos genes <i>bla</i>	48

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Número e porcentagem de espécies da família <i>Enterobacteraceae</i> produtoras de ESBL nos setores do hospital, Julho/2004 a Junho/2005.....	54
Tabela 2 - Distribuição em número e porcentagem de cepas contendo genes <i>bla</i> para grupos de ESBL, Julho/2004 a Junho/2005.....	58
Tabela 3 - Distribuição em número e porcentagem de cepas de <i>K. pneumoniae</i> e respectivos perfis moleculares por setor do hospital, de Julho/2004 a Junho/2005.....	62

Lista de Figuras

Figura 1 – Anel β -lactâmico.....	11
Figura 2 – Estrutura molecular das β -lactamases.....	15
Figura 3 - Método da combinação de discos	45
Figura 4 - Exemplos da detecção de genes <i>bla</i> em algumas espécies da família <i>Enterobacteriaceae</i>	57
Figura 5 – Representação gráfica da matriz de similaridade de Dice, dos perfis obtidos por meio de PFGE em cepas de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBL isoladas na instituição, no período de Julho de 2004 a Junho de 2005.....	60
Figura 6 – PFGE – exemplos de cepas de <i>K. pneumoniae</i> apresentando perfis distintos.....	60
Figura 7 - Representação gráfica da matriz de similaridade de Dice, dos perfis obtidos por meio de PFGE em cepas de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBL isoladas no Berçário do hospital, no período de Agosto de 2004 a Fevereiro de 2005.....	61
Figura 8a – Representação gráfica da distribuição dos perfis moleculares observados no hospital, de 20-26 de Junho (semana 1) a 25-31 de dezembro (semana 28) de 2004.....	64
Figura 8b – Representação gráfica da distribuição dos perfis moleculares observados no hospital, de 1-7 de janeiro (semana 29) a 24-30 de junho (semana 54) de 2005.....	64
Figura 9 – Representação gráfica da distribuição dos perfis moleculares observados no Berçário do hospital, de 31/7-6/8 de 2004 (semana 7) a 5-11/2 de 2005 (semana 35).....	65
Figura 10a - Representação gráfica da distribuição de cepas de ESBL- <i>Kp</i> isoladas em pacientes do Berçário no período do surto, provenientes de infecções, de 31/7-6/8 (semana 7) a 20-26/9 de 2004 (semana 23).....	66
Figura 10b - Representação gráfica da distribuição de cepas de ESBL- <i>Kp</i> colonizadoras, isoladas em pacientes do Berçário no período do surto, provenientes de culturas de vigilância, de 20-26/11 (semana 20) a 12-18/12 (semana 35) de 2004.	67

Figura 11 – Representação gráfica da distribuição dos perfis moleculares PF 1, PF 4 e PF 1-4 no hospital, de 20-26 de junho de 2004 (semana 1) a 5-11 de fevereiro de 2005 (semana 33).....	69
Figura 12 – Representação gráfica da distribuição dos Perfis PF 3, PF 5 e PF 3-5 de cepas de <i>K. pneumoniae</i> no hospital, de 25-31 de dezembro (semana 28) a 12-18 de Fevereiro de 2005 (semana 34).....	70
Figura 13 - Representação gráfica da distribuição dos Perfis PF 7, PF 8 e PF 7-8 de cepas de <i>K. pneumoniae</i> no hospital, 20-26 de junho (semana 1) a 18-24 de dezembro (semana 25) de 2004.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

1.1.1 *Infecção Hospitalar*

Infecção hospitalar é, por definição, uma reação adversa, local ou sistêmica, que pode se expressar no curso da internação ou no pós-alta, desencadeada pela presença de um agente infeccioso e/ou sua toxina. Deve ser adquirida após a internação e relacionada a procedimentos diagnósticos ou terapêuticos, sem evidências de que esteja presente, ou em incubação, no momento da admissão hospitalar (BRASIL 1998).

As infecções hospitalares contribuem para maiores índices de morbidade e mortalidade, tempos de internação prolongados, custos altos, e principalmente trazem a ameaça constante de disseminação de bactérias multi-resistentes (FAR *et al.* 2001).

Não há dados consistentes sobre a incidência de infecção hospitalar no Brasil. Em 1994, segundo estudo realizado pelo Ministério da Saúde, este índice era de 15,5% entre os pacientes internados. Esta porcentagem de acordo com a média aceita pela Organização Mundial da Saúde, que varia entre 9% e 20%, porém muito acima da média mundial de índice de infecção hospitalar em países desenvolvidos, que é de 5 a 10%. Em países em desenvolvimento, esta média pode ser de até 25% (OPAS 2000; OMS 2004).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) promove campanhas e programas para que o Brasil conheça e mude a realidade atual de seus hospitais.

Comissões de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH) estão atualmente interligadas às vigilâncias sanitárias municipais e estaduais, por meio do Sistema Nacional de Informação para o Controle de Infecções em Serviços de Saúde (SINAIS), para que forneçam dados que gerem indicadores sobre infecção hospitalar, porém, segundo a própria ANVISA, apenas 38% dos hospitais do país possuem CCIH atuantes, o que constitui mais um desafio para a agência (ANVISA 2001; ANVISA 2002).

A criação e estruturação das CCIH no Brasil tornou-se obrigatória pela portaria 196/83 do Ministério da Saúde, a qual foi substituída pela Portaria 930, de agosto de 1992 e, posteriormente, pela Portaria 2616 em maio de 1998. Após a passagem da competência das atividades para a ANVISA em 1999, iniciou-se o Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar (PNCIH), em 2000. Os serviços foram estruturados para que os profissionais da CCIH formada realizassem vigilância epidemiológica das infecções relacionadas à assistência à saúde (ANVISA 2000; Brasil 1997; BRASIL 1998).

Baseada em informações clínicas, microbiológicas e epidemiológicas, como microrganismos prevalentes, mecanismos de resistência, distribuição pelos setores do hospital, principais antibióticos prescritos, e dados de epidemiologia molecular, a CCIH de cada instituição pode adotar medidas que podem trazer o sucesso do controle das infecções e da disseminação de cepas resistentes. A literatura cita algumas destas medidas, como restrição do uso de antimicrobianos de amplo espectro, monitoramento de pacientes colonizados, uso alternado das classes de antimicrobianos (para limitar a pressão seletiva na flora hospitalar bacteriana), cuidados especiais com barreiras de proteção utilizadas pelos profissionais a serviço

do hospital, cuidados na manipulação de equipamentos invasivos, higienização de fômites, lavagem correta das mãos, e vigilância clínica e epidemiológica de pacientes admitidos nas UTI (PEÑA *et al.* 1998; BRADFORD 2001; LAUTENBACH *et al.* 2001; PEÑA *et al.* 2001; PESSOA-SILVA *et al.* 2003; SAMAHA-KFOURY e ARAJ 2003; STÜRENBURG e MACK 2003).

O Núcleo de Apoio ao Controle de Infecção Hospitalar (NACIH), que reúne membros da CCIH de hospitais vinculados ao Programa de Qualidade Hospitalar da Associação Paulista de Medicina e do Conselho Regional de Medicina de São Paulo, reúne-se desde 1998 para discutir e solucionar falhas relacionadas ao controle de infecções hospitalares e à resistência antimicrobiana. Em 2000, por exemplo, o NACIH constatou que no Brasil a utilização dos procedimentos invasivos é semelhante à dos hospitais americanos, porém com risco dobrado de infecção destes procedimentos (NACIH 1998 e 2003).

Há atualmente uma preocupação mundial em se controlar as infecções de origem hospitalar, e a disseminação da resistência bacteriana aos antimicrobianos disponíveis (TOSIN *et al.* 2003).

Muitos programas de controle, nacionais e internacionais, foram lançados desde o fim da década de 1990, todos visando a conscientização sobre o uso racional de antimicrobianos, o controle da disseminação de cepas resistentes e/ou de seus genes, além da pesquisa sobre os mecanismos de transmissão da resistência e novos métodos de detecção da mesma.

Alguns exemplos desses programas são: Projeto *Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology* (ICARE), da Escola Rollins de Saúde Pública da Universidade de Emory (Atlanta, Geórgia), desde 1995; SENTRY *Antimicrobial*

Surveillance Program, desde 1997; *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information* (MYSTIC), desde de 1997; *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS), desde 1998; *Preventing Emerging Infectious Diseases: a Strategy for de 21st Century*, do *Center for Diseases Control* (CDC), em 1998; *Paul-Ehrlich-Gesellschaft* (PEG), desde 1998 (Alemanha); *Task Force on Antimicrobial Resistance* (TFAR), da *Food and Drug Administration* (FDA), desde 1999; e *Pan-European Antimicrobial Resistance using Local Surveillance* (PEARLS), desde 2001 (Rollins SPH 1995; CDC 1998; FDA 2000; OTEO *et al.* 2002; SADER *et al.* 2003; STÜRENBURG e MACK 2003; TENOVER *et al.* 2003; BOUCHILLON *et al.* 2004).

Segundo dados de todos os programas citados, as bactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) são, entre as Gram negativas, as maiores responsáveis pela ocorrência e disseminação mundial de resistência em ambientes hospitalares. Desde seu surgimento, estas enzimas tiveram evolução rápida e foram isoladas em muitos países (CDC 1998; ANVISA 2001; BRADFORD 2001; Rollins SPH 1995; STÜRENBURG e MACK 2003).

As cepas produtoras podem fazer parte da flora bacteriana normal de indivíduos, além de terem capacidade de adesão a equipamentos invasivos utilizados em pacientes hospitalizados (PEÑA *et al.* 1998; LAUTENBACH *et al.* 2001; PEÑA *et al.* 2001; PESSOA-SILVA *et al.* 2003; STÜRENBURG e MACK 2003).

Os principais fatores de risco para o aparecimento de infecções hospitalares, especialmente por microrganismos resistentes, são o uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro, internações prolongadas (principalmente em UTI), aumento do número de transferências entre unidades e hospitais, severidade da

doença, entubação e ventilação mecânica, uso de cateteres em geral, e exposição prévia a antimicrobianos de qualquer classe. No caso de UTI neonatais, fatores como sexo e peso ao nascer também são inclusos (KLIEBE *et al.* 1985; PEÑA *et al.* 1998; BRADFORD, 2001 LAUTENBACH *et al.* 2001; BERMEJO *et al.* 2003; DAOUD e HAKIME 2003; PESSOA-SILVA *et al.* 2003; STÜRENBURG e MACK 2003).

1.1.2 Resistência a Antimicrobianos

Na década de 1940, a grande disponibilidade de penicilina e o posterior descobrimento da estreptomicina levaram a uma acentuada redução das doenças e mortes causadas por doenças infecciosas. Infelizmente, o surgimento da resistência bacteriana reverteu este progresso trazido pelas drogas miraculosas desenvolvidas nos últimos 50 anos. Neste início de século há muitas opções importantes de drogas para o tratamento de infecções comuns tornando-se cada vez mais limitadas, dispendiosas e, em alguns casos, inexistentes (CDC 1998).

O aumento da resistência antimicrobiana de bactérias patogênicas observado nos últimos 20 anos é considerado um dos maiores problemas da medicina humana. Diversos aspectos desta situação são especialmente preocupantes. Há mecanismos de resistência que eliminam o uso da última opção terapêutica para o tratamento de vários tipos de infecção. Muitos destes mecanismos que surgem e são disseminados nas populações bacterianas possuem amplo espectro de ação, o que compromete todas ou a maioria das drogas pertencentes a um dado grupo terapêutico. Dados de pacientes de unidades de terapia intensiva dos Estados Unidos mostram que 28% das bactérias que causam infecções hospitalares com mais frequência são resistentes ao

antimicrobiano de escolha para o tratamento (CDC 1998; GNIADKOWSKI 2001; DZIDIC e BEDKOVIC 2003).

Os mecanismos de resistência são parte da evolução natural das bactérias, que os utilizam com o objetivo de sobrevivência. Quando as células bacterianas são expostas a antimicrobianos inadequados, em doses inadequadas, as cepas suscetíveis são destruídas e somente sobrevivem as resistentes, ao que se chama pressão seletiva. Para que cada célula se defenda, cresça e se divida o mais rápido possível para aumentar o número de indivíduos, ela pode utilizar mecanismos naturais de defesa, sofrer mutações que originam sua resistência ou adquirir genes de resistência de outras células, por conjugação plasmidial (FORBES *et al.* 1998; KONEMAN *et al.* 2001).

A resistência a antimicrobianos mediada pelas bactérias ocorre devido a características codificadas geneticamente, podendo ser intrínseca ou adquirida. Resistência intrínseca é aquela resultante da genética, estrutura e fisiologia natural do microrganismo. Sendo assim, ocorre em grupos específicos, e é útil na escolha dos antimicrobianos a serem incluídos no teste de sensibilidade para determinados microrganismos. A resistência adquirida resulta da alteração da estrutura e fisiologia celular, causada por mudanças na genética normal do microrganismo. Pode ser adquirida por mutação genética, aquisição de genes de outros organismos, ou uma associação de ambas. Ao contrário da resistência intrínseca, ocorre em apenas algumas cepas de um grupo ou espécie de organismos (FORBES *et al.* 1998; DZIDIC & BEDEKOVIC, 2003).

Toda estratégia de resistência bacteriana é codificada por um ou mais genes, os quais podem ser compartilhados entre cepas até mesmo de gêneros diferentes, por

mecanismos moleculares específicos. Então, a resistência pode se expandir para um grande número de bactérias clinicamente significativas, e/ou uma única cepa pode adquirir resistência múltipla (FORBES *et al.* 1998; GNIADKOWSKI 2001).

Os genes de resistência bacteriana variam de acordo com sua localização, tipo de transferência e expressão (KONEMAN *et al.* 2001).

A localização desses genes pode ser cromossômica, o que confere uma certa estabilidade genética ao microrganismo, ou extra-cromossômica, em elementos móveis como plasmídios, que são moléculas circulares de DNA atuando independentemente do cromossomo, sendo facilmente mobilizados para transferência horizontal de uma célula bacteriana a outra. Há também elementos chamados transposons, que são segmentos de DNA que se movem pelo genoma, sendo capazes de se auto-replicarem e aumentar o tamanho do DNA. Dentro destes, pode haver integrons, elementos que capturam e mobilizam genes contidos em cassetes (LEWIN 1995a,c; DZIDIC & BEDEKOVIC, 2003; FLUIT & SCHMITZ 2004).

O mecanismo mais comum pelo qual os genes de resistência são transferidos é a conjugação. Esta requer contato célula a célula, através de um pilus sexual especializado, codificado por um plasmídio denominado F. Assim que o contato se estabelece, o plasmídio circular F começa a ser replicado, e uma das cadeias simples de DNA plasmidial passa para a célula receptora através do pilus. A cadeia simples começa a ser replicada à medida que entra na célula, formando-se ao final duas células contendo plasmídios conjugativos completos. Outros mecanismos de transferência genética são a transdução, que é uma permuta de informação genética através de bacteriófagos (vírus que infectam as células bacterianas), e a transformação, que é a transferência direta de DNA entre espécies compatíveis,

através da incorporação de DNA livre no meio circundante por células fisiologicamente competentes para isso, normalmente no final da fase de crescimento exponencial ou fase log (LEWIN 1995b; SNYDER & CHAMPNESS 1997a,b; DZIDIC & BEDEKOVIC, 2003).

A expressão dos genes de resistência pode ou não ser dependente da exposição a algum estímulo. A expressão indutiva só ocorre na presença de estímulo (ex.: produção de β -lactamase na presença do antimicrobiano β -lactâmico), a constitutiva independe deste estímulo e a constitutiva-indutiva aumenta quando exposta a algum estímulo (KONEMAN *et al.* 2001).

As células bacterianas podem impedir a ação dos agentes antimicrobianos por inativação enzimática, alteração de receptores e/ou de permeabilidade, ou por transporte alterado da droga. Algumas espécies são capazes de expressar diversos tipos de mecanismos de resistência, dependendo do antimicrobiano com o qual entram em contato (KONEMAN *et al.* 2001; DZIDIC & BEDEKOVIC, 2003).

Alguns tipos de resistência podem ser adquiridos por uma única mutação genética, como a alteração de alvo da enzima DNA-girase que resulta em resistência às fluoroquinolonas. Outros mecanismos de resistência são muito mais complexos e consistem em genes que codificam a produção de enzimas altamente específicas que inativam diversos antimicrobianos, como β -lactâmicos e aminoglicosídeos (SHLAES *et al.* 1997).

As principais classes de antimicrobianos, seu mecanismo de ação, espectro de atividade e mecanismos de resistência, estão resumidos no Quadro 1.

Quadro 1 - Principais Grupos de Antimicrobianos

CLASSE	MECANISMO DE AÇÃO	ESPECTRO DE ATIVIDADE	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA
Aminoglicosídeos Amicacina Canamicina Estreptomicina Gentamicina Netilmicina Tobramicina	Inibem a síntese protéica, fixando-se à Subunidade ribossomal 30S.	Bactérias aeróbias, Gram positivas e negativas.	Alterações enzimáticas; Diminuição da captação da droga pela célula devido à perda de proteínas porinas; Alvos da célula bacteriana alterados por mutação.
Beta-lactâmicos Cefalotina Cefotetan Ceftazidima Cefepime	Inibem a síntese da parede celular, fixando-se às proteínas fixadoras de penicilina (PBPs - <i>penicillin-binding proteins</i>), impedindo a produção de peptidoglicanos.	Bactérias Gram positivas e negativas, com espectro variado para cada droga.	Destruição enzimática por β -lactamases; Alvos da célula bacteriana alterados por mutação; Diminuição da captação da droga pela célula devido à perda de proteínas porinas.
Cloranfenicol	Inibe a síntese protéica, fixando-se à Subunidade ribossomal 50S.	Bactérias Gram positivas e negativas.	Alterações enzimáticas; Diminuição da captação da droga pela célula devido à perda de proteínas porinas.
Fluoroquinolonas Ciprofloxacina Norfloxacina Ofloxacina	Inibem a síntese de DNA, fixando-se às DNA-girases.	Bactérias Gram positivas e negativas, com espectro variado para cada droga.	Diminuição da captação da droga pela célula devido à perda de proteínas porinas; Alvos da célula bacteriana alterados por mutação.
Glicopeptídeos Vancomicina	Inibem a síntese da parede celular. Interação com precursores e impedem sua incorporação à nova parede celular.	Bactérias Gram positivas.	Alvos da célula bacteriana alterados por mutação.
Macrolídeos, Lincosamidas e Streptogramina (grupo MLS) Azitromicina Clarithromicina Clindamicina Eritromicina	Inibem a síntese protéica, fixando-se à Subunidade ribossomal 50S.	Maioria das bactérias Gram positivas e algumas Gram negativas.	Alterações enzimáticas; Alvo ribossomal alterado; Sistema de efluxo da droga pela célula, diminuindo sua concentração intracelular.

(continua)

Quadro 1 (cont.) - Principais Grupos de Antimicrobianos

CLASSE	MECANISMO DE AÇÃO	ESPECTRO DE ATIVIDADE	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA
Metronidazol	Rompe o DNA. Mecanismo exato incerto.	Bactérias Gram negativas, e algumas Gram positivas e anaeróbias.	Bactérias aeróbias não são capazes de reduzir anaerobicamente a droga à sua forma ativa.
Nitrofurantoína	Prejudica o DNA. Mecanismo exato incerto.	Bactérias Gram positivas e negativas.	
Polimixinas Polimixina B Colistina	Rompem a membrana celular.	Bactérias Gram negativas, com pouca atividade contra Gram positivas.	
Rifampicina	Inibe a síntese de RNA, fixando-se à RNA-polimerase DNA-dependente.	Bactérias Gram positivas, e algumas Gram negativas.	Alteração de alvo enzimático (RNA-polimerase DNA-dependente).
Sulfonamidas	Interferem na via do ácido fólico, fixando-se à enzima diidropteroato-sintetase.	Bactérias Gram positivas e muitas Gram negativas.	Alteração de alvos enzimáticos.
Tetraciclina	Inibem a síntese protéica, fixando-se à subunidade ribossomal 30S.	Bactérias Gram positivas e negativas, e muitos patógenos intracelulares.	Sistema de efluxo da droga pela célula, diminuindo sua concentração intracelular; Inativação enzimática; Alvo ribossomal alterado.
Trimetoprim	Interferem na via do ácido fólico, fixando-se à enzima diidrofolato-redutase.	Bactérias Gram positivas e muitas Gram negativas.	Alteração de alvos enzimáticos.

Fontes: FORBES *et al* 1998; KONEMAN *et al*. 2001.

1.1.3 Antimicrobianos β -Lactâmicos

Os compostos β -lactâmicos são o maior grupo de antimicrobianos, com ação geralmente bactericida e baixa toxicidade em humanos. Agem como inibidores da síntese da parede celular bacteriana, estrutura vital para as bactérias e inexistente nas células humanas, o que a torna o foco de atenção para o desenvolvimento de novas drogas.

A base da estrutura molecular dos compostos β -lactâmicos é um anel β -lactâmico central (Figura 1), o qual é a chave para o mecanismo de ação dessas drogas na parede celular através da ligação às enzimas envolvidas na síntese. A estrutura destes compostos pode ser manipulada para se obter maior atividade e mais aplicações terapêuticas.

Figura 1 - Anel β -lactâmico.

Os principais grupos de β -lactâmicos são as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenens. A estrutura molecular de cada grupo e os exemplos de antimicrobianos pertencentes a eles estão representados no Quadro 2.

Quadro 2 – Principais grupos de β -lactâmicos.

Grupos de β -lactâmicos	Exemplos	Estrutura Molecular Básica
Penicilinas	Amoxicilina Ampicilina Oxacilina Penicilina Piperacilina Ticarcilina
Cefalosporinas	Cefazolina Cefalotina Cefaloridina Cefalexina Cefaclor Cefuroxima Moxalactam Cefotetan Cefoxitina Cefixima Cefodizima Cefoperazona Cefotaxima Cefpodoxima Ceftazidima Ceftriaxona Cefepime Cefpirona Cefquinona
Primeira Geração. Segunda Geração. Segunda Geração ou Cefamicinas ou 7- α -metoxi-cefalosporinas. Terceira Geração. Quarta Geração.		
Monobactâmicos	Aztreonam
Carbapenems	Imipenem Meropenem Ertapenem

Fontes: FORBES *et al.* 1998; SAMAHA-KFOURY & ARAJ, 2003; STÜRENBURG & MACK, 2003.

Mecanismo de Ação

➤ Síntese da Parede Celular Bacteriana

A síntese da parede celular das bactérias ocorre em três estágios.

O primeiro estágio ocorre no citoplasma, onde são sintetizados os precursores de baixo peso molecular. No segundo estágio, as porções não-nucleotídicas dessas moléculas precursoras são transferidas sequencialmente para uma camada na membrana citoplasmática, e este processo é catalisado por enzimas de ligação à membrana. A camada lipídica funciona como ponto de ligação à membrana para os precursores e permite o transporte das subunidades através do interior hidrofóbico da membrana citoplasmática para a superfície externa (BARON *et al.* 1996).

O terceiro estágio da síntese envolve a polimerização das subunidades e a ligação do novo peptideoglicano à parede celular. A polimerização ocorre através da transferência da nova cadeia de peptideoglicanos de sua camada na membrana para a N-acetilglucosamina do novo peptideoglicano que já está ligado à membrana. O novo peptideoglicano é ligado ao peptideoglicano de parede celular pré-existente, através de uma reação de transpeptidase que envolve cadeias peptídicas de ambos os polímeros, sendo que um deles deve possuir um terminal D-alanil-D-alanina. Esta última reação é inibida pelos compostos β -lactâmicos (BARON *et al.* 1996).

➤ Entrada dos Compostos β -lactâmicos nas Células Bacterianas

Tanto bactérias Gram positivas como Gram negativas possuem uma mistura de elementos celulares no citoplasma. As primeiras têm uma membrana celular com uma espessa camada externa de peptideoglicanos, enquanto as últimas possuem uma

membrana plasmática interna e uma membrana celular lipoprotéica externa, entre as quais há uma camada fina de peptidoglicanos (KONEMAN *et al.* 2001).

Os compostos β -lactâmicos não necessitam atravessar a membrana plasmática para exercer sua atividade sobre microrganismos Gram positivos. Passam facilmente pela camada de peptidoglicanos e agem junto às transpeptidases na formação da parede celular (KONEMAN *et al.* 2001).

Já nas bactérias Gram negativas, as duas membranas existentes servem de barreira para os antimicrobianos β -lactâmicos, porque seu alvo de ação fica no interior da célula, após a membrana externa e o espaço periplasmático. Mesmo substâncias altamente lipofílicas têm dificuldade de se difundirem diretamente para o interior da célula devido à natureza polarizada e assimétrica da membrana celular externa (KONEMAN *et al.* 2001).

Os compostos β -lactâmicos são transportados para o interior das células Gram negativas principalmente através de proteínas chamadas porinas. Normalmente há uma porina de canal amplo (OmpF) e uma de canal pequeno (OmpC) na membrana celular externa. O tamanho, a carga e a hidrofobicidade das moléculas que tentam entrar na célula influenciam na velocidade e efetividade desse transporte. O imipenem, por exemplo, tem excelente desempenho por ser um composto pequeno, hidrofílico, e com cargas positivas e negativas equilibradas (KONEMAN *et al.* 2001).

➤ **Ação dos Compostos β -lactâmicos**

O anel β -lactâmico desencadeia uma reação de acilação com as transpeptidases, promovendo uma ligação cruzada dos polímeros citados

anteriormente. As enzimas envolvidas no processo final de formação da parede celular são as proteínas fixadoras de penicilina (PBPs – *penicillin-binding proteins*), às quais se ligam, então, os compostos β -lactâmicos. As PBPs normalmente impedem a ação das enzimas hidrolases, que ficam livres para lisar a parede celular. As PBPs são diferentes em microrganismos Gram positivos e Gram negativos e em espécies anaeróbias, o que pode explicar os diferentes espectros de atividade antimicrobiana dos β -lactâmicos em diferentes tipos bacterianos (BARON *et al.* 1996; SAMAHA-KFOURY & ARAJ, 2003).

1.1.4 Enzimas β -lactamases

A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos pode ocorrer pelas 3 vias citadas anteriormente (inativação enzimática, alteração de receptores ou por transporte alterado da droga), sendo a destruição enzimática da droga a via mais comum, através da produção de β -lactamases (Figura 2).

Figura 2 – Estrutura molecular das β -lactamases.

A primeira β -lactamase mediada por plasmídio em microrganismos Gram negativos, TEM-1, foi descrita no início da década de 1960. Foi encontrada em uma

cepa de *Escherichia coli* isolada do sangue de uma paciente chamada Temoniera, na Grécia. A localização plasmidial e/ou em transposons facilitou a disseminação da TEM-1 para outras espécies bacterianas (BRADFORD, 2001; SAMAHA-KFOURY & ARAJ, 2003; STÜRENBURG & MACK, 2003)

Outro tipo de β -lactamase é a SHV-1 (de “sulfidril variável”), codificada cromossomicamente na maioria das cepas de *Klebsiella pneumoniae*, o que confere resistência intrínseca à ampicilina nesta espécie, e normalmente mediada por plasmídios em *E. coli* (BRADFORD, 2001).

Origem e Função

Beta-lactamases e PBPs possuem origem evolutiva comum, e ambas necessitam interagir com os compostos β -lactâmicos para exercerem sua função. Foram originadas provavelmente devido à pressão seletiva exercida por organismos existentes no solo, produtores de compostos β -lactâmicos (BRADFORD 2001; KONEMAN *et al.* 2001).

As PBPs de alto e de baixo peso molecular possuem seqüências de aminoácidos similares às das β -lactamases, além de possuírem semelhanças nas suas conformações e estruturas tridimensionais. O mecanismo de ação de ambas baseia-se na ruptura de uma ligação amida por acilação enzimática. A especificidade das PBPs para os antimicrobianos β -lactâmicos determina a sensibilidade da bactéria à droga, assim como a especificidade das β -lactamases aos β -lactâmicos determina a eficácia da hidrólise dos mesmos através da enzima. Uma mutação pontual em um ou mais aminoácidos, em uma área estruturalmente crítica da enzima, pode causar a

inutilização do antimicrobiano β -lactâmico através da alteração da especificidade da molécula enzimática (KONEMAN *et al.* 2001).

A síntese das β -lactamases pode ser cromossômica (constitutiva) ou mediada por plasmídios (indutiva). A produção destas enzimas pode ser induzida tanto pela presença de β -lactâmicos como de precursores da parede celular no meio extracelular (KONEMAN *et al.* 2001; SAMAHA-KFOURY & ARAJ, 2003).

A provável função fisiológica dessas enzimas é de reestruturar o peptidoglicano durante o crescimento da célula bacteriana (KONEMAN *et al.* 2001).

Localização e Transferência Genética

Tanto microrganismos Gram positivos como Gram negativos podem produzir β -lactamases. Dos Gram positivos os mais comuns são os estafilococos, em que 90% ou mais das cepas são resistentes à penicilina como resultado da produção da enzima. Raras cepas de enterococos também podem produzir β -lactamases (FORBES *et al.* 1998).

As β -lactamases produzidas pelos microrganismos Gram positivos são em sua maioria indutivas de Classe A, localizadas em plasmídios e excretadas no meio extracelular, onde ocorre a hidrólise do composto β -lactâmico antes que este se ligue às PBPs na membrana celular. Os plasmídios dessas bactérias são transferidos por transdução, através de bacteriófagos. As β -lactamases estafilocócicas são capazes de hidrolisar a penicilina e a maioria de seus derivados, porém não conseguem hidrolisar efetivamente muitas cefalosporinas e carbapenens (FORBES *et al.* 1998; KONEMAN *et al.* 2001; SAMAHA-KFOURY & ARAJ, 2003).

As bactérias Gram negativas produzem muitos tipos diferentes da enzima, que pode ser codificada por genes cromossômicos ou plasmidiais, e podem hidrolisar a maioria dos β -lactâmicos. Nesse grupo está inclusa a família *Enterobacteriaceae* e outras bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (FORBES *et al.* 1998; SAMAHA-KFOURY & ARAJ, 2003).

Nos microrganismos Gram negativos, a enzima permanece no espaço periplasmático intracelular, estrategicamente posicionada para hidrolisar o composto β -lactâmico após este transpor a membrana externa através de porinas (FORBES *et al.* 1998).

Classificação

As enzimas β -lactamases já foram classificadas de três formas diferentes.

O primeiro esquema sugerido foi o de Richmond e Sykes, 1973, baseado no perfil do substrato das enzimas e na localização do gene codificador das mesmas. Em 1980, foi desenvolvida a classificação molecular de Ambler, baseada nas seqüências de nucleotídeos e aminoácidos das enzimas, denominando-as A, B, C ou D. Em 1995, Bush, Jacoby e Medeiros propuseram um esquema baseado nas propriedades bioquímicas, estrutura molecular e seqüência nucleotídica das enzimas, separando-as em grupos funcionais. Os três esquemas de classificação estão representados no Quadro 3 (RICHMOND & SYKES 1973; BUSH *et al.* 1995; BRADFORD 2001; KONEMAN *et al.* 2001; SAMAHA-KFOURY & ARAJ, 2003).

Quadro 3 - Esquema de Classificação para β -lactamases.

Richmond e Sykes 1973	Classificação Molecular de Ambler 1980	Bush, Jacoby e Medeiros 1995	Características	Inibidas por:		Enzimas Representativas	Número estimado de Enzimas
			Substratos Preferenciais	Clavulanato	EDTA		
Ia, Ib, Id	C	1	Cromossômicas ou Plasmidiais	não	não	AmpC de bactérias Gram negativas; MIR-1	51
			β -lactâmicos, exceto Carbapenens				
não incluída	A	2 ^a	Penicilinas	sim	não	Penicilinas de bactérias Gram positivas	23
			Penicilinas				
III	A	2b	β -lactamases de amplo espectro	sim	não	TEM-1, TEM-2, SHV-1	16
			Penicilinas e Cefalosporinas				
não incluída, exceto a K1 na classe IV	A	2be	ESBL (β -lactamases de espectro estendido)	sim	não	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, e grupo OXY ou K1 da <i>K. oxytoca</i>	119
			Penicilinas, Oximino-Cefalosporinas e monobactâmicos				
não incluída	A	2br	β -lactamases resistentes a inibidores	modestamente	não	TEM-30 a TEM-36; TRC-1	24
			Penicilinas				
II, V	A	2c	Carbenicilinas	sim	não	PSE-1, PSE-3, PSE-4	19
			Penicilinas e Carbenicilinas				
V	D	2d	Oxacilinas	modestamente	não	OXA-1 a OXA-11, PSE-2 (OXA-10)	31
			Penicilinas e Cloxacilina; Carbapenens (parcialmente).				
Ic	A	2e	Cefalosporinas	sim	não	Cefalosporinas induzíveis de <i>Proteus vulgaris</i>	20
			Cefalosporinas				
não incluída	A	2f	Penicilinas	sim	não	NMC-A de <i>Enterobacter cloacae</i> ; Sme-1 de <i>Serratia marcescens</i> ; KPC-1 e -2 de <i>K. pneumoniae</i> ; GES-2 de <i>P. aeruginosa</i> .	4
			Penicilinas, Cefalosporinas e Carbapenens				
não incluída	B	3	MBL (metalo- β -lactamases)	Não	sim	L1 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ; CcrA de <i>Bacteroides fragilis</i> ; Grupos IMP e VIM.	24
			Todos os β -lactâmicos, exceto monobactâmicos				
não incluída	Não Determinada	4	enzimas não seqüenciadas e não classificadas				9

Fontes: Bush *et al.* 1995; Shah *et al.* 2004.

Mecanismo de Ação

As β -lactamases clivam o anel β -lactâmico, alterando assim a estrutura do antimicrobiano, que não consegue se ligar efetivamente às PBPs, o que permite que a síntese da parede celular bacteriana continue normalmente (FORBES *et al.* 1998).

O mecanismo de ação das β -lactamases é baseado no seu resíduo do aminoácido serina. As enzimas possuem um sítio de ação que consiste em uma cavidade longitudinal estreita, com um bolso oxianion em sua base, construído para conferir flexibilidade conformacional em termos de fixação do substrato. Próximo a esta cavidade está o resíduo de serina, que reage irreversivelmente com o radical carbonila do anel β -lactâmico, o qual se abre (SAMAH-KFOURY & ARAJ, 2003).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL)

2.1.1 Definição e Histórico

Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) são, por definição, enzimas da classe molecular A ou D (classificação de Ambler), ou das classes 2be ou 2d (classificação de Bush, Jacoby e Medeiros), capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração (oximino-cefalosporinas) 10% a mais do que hidrolisam as benzilpenicilinas, possuem sítio de ação contendo o aminoácido serina como resíduo catalítico principal, e geralmente são inibidas por compostos como ácido clavulânico (clavulanato), sulbactam e/ou tazobactam (BUSH *et al.* 1995; BRADFORD 2001; STÜRENBURG e MACK 2003; PFALLER & SEGRETÍ 2006).

A primeira ESBL foi observada na Europa, em 1983, em uma única cepa de *Klebsiella ozaenae*, e denominada SHV-2 devido à grande homologia observada com os genes *bla* da β -lactamase SHV-1, sua precursora. Desde então, cepas produtoras de ESBL têm sido descritas em muitos países, inclusive no Brasil. Sua prevalência é hoje provavelmente subestimada devido à sua dificuldade de detecção e à inconsistência dos relatos existentes (KLIEBE *et al.* 1985; CDC 1998; BRADFORD 2001; LAUTENBACH *et al.* 2001; DAOUD & HAKIME 2003; PESSOA-SILVA *et al.* 2003; SADER *et al.* 2003; STÜRENBURG & MACK 2003).

As enzimas ESBL e seus precursores têm localização plasmidial, porém podem ter sido originadas nos cromossomos, uma vez que a maioria das enterobactérias contém enzimas cromossômicas constitutivas (Classe C) produzidas

em baixos níveis, variando conforme a espécie. Os plasmídios que carregam os genes codificadores das ESBL podem levar também determinantes de resistência a aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicol, trimetoprim e sulfonamidas (BRADFORD 2001; GNIADKOWSKI 2001; COQUE *et al.* 2002; HERNÁNDEZ *et al.* 2003; SAMAHA-KFOURY e ARAJ 2003).

2.1.2 Principais espécies produtoras de ESBL

De maneira geral, as ESBL podem ser encontradas na família *Enterobacteriaceae* e em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (BRADFORD 2001; DZIDIC e BEDEKOVIC 2003; COLODNER 2005).

Klebsiella pneumoniae é a espécie em que se descreve produção de ESBL com maior frequência, sendo que 2 a 5% das infecções hospitalares, principalmente respiratórias e urinárias, estão associadas a esta espécie. Segundo dados de programas internacionais de vigilância no Brasil (SENTRY e MYSTIC), a prevalência de isolamento de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL é de aproximadamente 50%. É um importante patógeno hospitalar, com potencial para causar morbidade severa e mortalidade em pacientes pediátricos. É parte da flora intestinal normal, e sua virulência está associada à presença de uma cápsula polissacarídica, sistema de captação de ferro, fenótipo mucóide e lipopolissacarídeo tóxico. Podem sobreviver por muito tempo na pele e em ambientes secos, como superfícies hospitalares, além de adquirir plasmídios conjugativos com certa facilidade, os quais podem carregar também genes para outros tipos de resistência, como para aminoglicosídeos. É intrinsicamente resistente à ampicilina, devido à presença da β -lactamase cromossômica SHV-1, pode produzir enzimas plasmidiais

como a AmpC (normalmente constitutiva em diversas espécies), metalo- β -lactamases (MBL) e carbapenemases (KPC), além de poder expressar resistência devido à perda de porinas (GOUBY *et al.* 1994; PEÑA *et al.* 1998 e 2001; YUAN *et al.* 1998; BABINI & LIVERMORE 2000; MENDES *et al.* 2000; SADER 2000; MARTINS-LOUREIRO *et al.* 2001; SADER *et al.* 2001; NORDMANN e POIREL 2002; YONG *et al.* 2002; HERNÁNDEZ *et al.* 2003; PESSOA-SILVA *et al.* 2003; CARTELLE *et al.* 2004; JACOBY *et al.* 2004; PFALLER & SEGRETI 2006).

No Brasil, há relatos de isolamento de cepas de *K. pneumoniae* multi-resistentes em pacientes internados. Mendes *et al.* (2004) relatam o caso de uma cepa de *K. pneumoniae* pertencente ao programa MYSTIC no Brasil. A cepa foi isolada da urina de um paciente que também desenvolveu pneumonia por *Acinetobacter* spp e *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina durante sua internação, que foi de 34 dias, tendo recebido grande carga de antimicrobianos durante este período. A investigação detalhada da cepa de *K. pneumoniae* concluiu que a mesma era produtora da ESBL SHV-4 e não possuía uma proteína de membrana externa, ou seja, não apresentava uma porina, o que provavelmente foi responsável pela baixa sensibilidade da cepa aos carbapenens (meropenem e imipenem).

Lincopan *et al.* (2005) relatam o primeiro caso de isolamento de *K. pneumoniae* produtora de metalo- β -lactamase (MBL) na América Latina (KPBr1). A cepa foi isolada do sangue de um paciente cuja internação durou 53 dias após um acidente vascular cerebral, com diagnóstico posterior de pneumonia por *Acinetobacter baumannii* e outras infecções secundárias e colonizações. A cepa KPBr1, produtora de ESBL do grupo CTX-M e resistente à maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos e aztreonam, também expressava resistência ao

imipenem e a inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico e tazobactam) devido à produção da MBL IMP-1. A presença destas duas enzimas contribuíram para a falha terapêutica e morte do paciente.

Escherichia coli e *Klebsiella oxytoca* ESBL positivas também são comumente notificadas como responsáveis por infecções hospitalares. Porém, outras enterobactérias como *Enterobacter* spp, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Providencia* spp, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Shigella* spp e *Salmonella* spp também têm sido descritas freqüentemente como produtoras de diversos tipos de ESBL, isoladas em diversas amostras biológicas, como sangue, abscessos, pontas de cateteres, pulmões, fluido peritonial, lavado bronco-alveolar e orofaringe (BRADFORD 2001; CHANAWONG *et al.* 2001; AITMHAND *et al.* 2002; CANTÓN *et al.* 2002; CAO *et al.* 2002; PAGANI *et al.* 2002; QUALE *et al.* 2002; AIBINU *et al.* 2003; DHAWAN *et al.* 2003; DZIDIC e BEDEKOVIC 2003; MOTTA *et al.* 2003; MULVEY *et al.* 2003; QUINTEROS *et al.* 2003; YU *et al.* 2003; KIM *et al.* 2004a; KIM *et al.* 2004b; NAUMIUK *et al.* 2004; TUMBARELLO *et al.* 2004; WU *et al.* 2004; HO *et al.* 2005; CELENZA *et al.* 2006).

2.1.3 Classificação

Todas as ESBL são derivadas de outras β -lactamases, após a ocorrência de uma ou mais mutações genéticas pontuais que são clonadas em certas áreas da enzima adjacentes aos 4 elementos estruturais evolutivos conservados que limitam o sítio de ação. As ESBL diferem de suas enzimas de origem por 1 a 7 substituições e algumas deleções de aminoácidos que alteram a configuração e as propriedades do seu sítio de ação. As substituições de aminoácidos ocorridas estendem esta região,

permitindo novas interações enzima-substrato com as oximino-cefalosporinas (BRADFORD 2001; STÜRENBURG e MACK 2003).

Atualmente há mais de 400 β -lactamases descritas, das quais mais de 300 são ESBL, com distribuição mundial (BRADFORD 2001; LAUTENBACH *et al.* 2001; DAOUD & HAKIME 2003; SAMAHA-KFOURY & ARAJ 2003; BUSH & JACOBY 2003).

A maioria das ESBL pertence à classe molecular A de Ambler, e pelo esquema de classificação de Bush, Jacoby e Medeiros, são classificadas como 2be ou 2d, podendo ou não ser inibidas pelo ácido clavulânico (BUSH *et al.* 1995; BRADFORD 2001).

As enzimas ESBL são agrupadas e denominadas de acordo com sua similaridade com enzimas precursoras e/ou com grupos já conhecidos.

A maioria das ESBL são derivadas das β -lactamases dos tipos TEM e SHV, das quais derivam 150 e 88 ESBL, respectivamente (BRADFORD 2001).

Outros tipos de ESBL, não menos importantes clinicamente, são: CTX-M, OXA, PER, VEB, CME, TLA, SFO, GES e BES, sendo que a última foi encontrada no Brasil (*Brazil extended-spectrum- β -lactamase*) em cepas de *Serratia marcescens*, em um estudo realizado entre 1996 e 1997. Outras ESBL identificada no Brasil são a SHV-27, em cepas de *K. pneumoniae* isoladas em hemoculturas de neonatos, por Corkill *et al.* (2001), e a CTX-M-8, em cepas clínicas de *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes* e *Citobacter amalonaticus*, em hospitais do Rio de Janeiro, por Bonnet *et al.* (2000b) (BONNET *et al.* 2000a; BRADFORD 2001; GNIADKOWSKI 2001; BUSH & JACOBY 2003; SAMAHA-KFOURY & ARAJ 2003; STÜRENBURG & MACK 2003).

2.1.3.1 Grupo TEM

A β -lactamase TEM-1 é a enzima mais comumente encontrada em microrganismos Gram negativos, localizada normalmente no transposon Tn3, que é muito pouco seletivo, o que permite que haja uma série de transposições e rearranjos envolvendo seu gene codificador *bla*_{TEM-1}. As enzimas deste grupo são comuns em diversas espécies de enterobactérias, principalmente *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (CAO *et al.* 2002; PAGANI *et al.* 2002; ARPIN *et al.* 2003; SANGUINETTI *et al.* 2003; STÜRENBURG & MACK, 2003; KIM *et al.* 2004; BIENDO *et al.* 2005; ENDIMIANI 2005).

Mais de 50-60% da resistência de *E. coli* à ampicilina se deve à presença de enzimas TEM-4, também responsáveis pela resistência de *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* à ampicilina e penicilina. É capaz de hidrolisar a penicilina e algumas cefalosporinas de primeira geração como cefalotina e cefaloridina (BRADFORD, 2001; SAMAHA-KFOURY & ARAJ, 2003; STÜRENBURG & MACK, 2003).

Seu primeiro derivado, TEM-2, apesar de ter sofrido substituição de um aminoácido, não teve seu perfil de substrato modificado, mesmo com a alteração em seu ponto isoelétrico de 5,4 para 5,6 (BRADFORD, 2001).

A primeira β -lactamase do tipo TEM a expressar o fenótipo ESBL foi a TEM-3, relatada em 1987. Após isso, mais de 100 derivados TEM foram descritos, sendo alguns resistentes a inibidores de β -lactamases e a grande maioria com fenótipo ESBL (BRADFORD, 2001; STÜRENBURG & MACK, 2003; BUSH & JACOBY, 2003).

As combinações das substituições de aminoácido que ocorrem em posições limitadas na enzima TEM resultam em diversas alterações nos fenótipos ESBL, como a habilidade de hidrolisar oximino-cefalosporinas específicas como ceftazidima e cefotaxima, ou alterar seus pontos isoelétricos de 5,2 para 6,5. Alguns resíduos de aminoácido são muito importantes para a produção do fenótipo ESBL quando as substituições ocorrem nessas posições (BRADFORD, 2001; STÜRENBURG & MACK, 2003; PFALLER & SEGRETÍ 2006).

Alguns exemplos são:

- glutamato por lisina na posição 104 ou 240;
- arginina por serina ou histiolina na posição 164; e
- glicina por serina na posição 238.

Outra enzima TEM descrita é a TEM-AQ, que contém, além de algumas substituições, a deleção de um aminoácido, que ainda não havia sido observada neste grupo de enzimas (BRADFORD, 2001).

As TEM- β -lactamases resistentes a inibidores (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam), em sua maioria, surgem independentemente da ação de ESBL, sendo relativamente inativas contra as oximino-cefalosporinas. Porém, algumas variantes como TEM-50 e TEM-68 retêm ambas as atividades em níveis significativos (STÜRENBURG & MACK, 2003).

2.1.3.2 Grupo SHV

As enzimas deste grupo são mais comumente encontradas em cepas de *K. pneumoniae*, em que *bla*_{SHV-1} ou outro gene relacionado está integrado no

cromossomo bacteriano. São responsáveis por até 20% da resistência à ampicilina mediada por plasmídios nesta espécie. São também resistentes à ticarcilina e piperacilina. Podem ser encontradas também em outras espécies de *Enterobacteriaceae* e em *Pseudomonas aeruginosa*. Atualmente há mais de 50 variantes ESBL da SHV-1 (COUDRON *et al.* 1997; PITOUT *et al.* 1998; BABINI & LIVERMORE 2000; BRADFORD, 2001; CHANAWONG *et al.* 2001; CAO *et al.* 2002; HOWARD *et al.* 2002; AIBINU *et al.* 2003; QUINTEROS *et al.* 2003; SAMAHA-KFOURY & ARAJ, 2003; SANGUINETTI *et al.* 2003; STÜRENBURG & MACK, 2003; KIM *et al.* 2004; HO *et al.* 2005; WU *et al.* 2006; PFALLER & SEGRETI 2006).

A alteração que ocorre no gene *blaSHV* que origina fenótipos de ESBL é basicamente a substituição de uma glicina por serina na posição 238 (Gli238Ser). Pode ocorrer também lisina por glutamato na posição 240, porém o mais interessante é que ambas as substituições se espelham às das ESBL do tipo TEM. O resíduo de serina na posição 238 é crítico para a hidrólise eficiente da ceftazidima, e o resíduo de lisina na posição 240 é crítico para a hidrólise da cefotaxima. O aumento da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a cefotaxima é maior que o da ceftazidima (BRADFORD, 2001; STÜRENBURG & MACK, 2003).

A maioria das β -lactamases SHV têm fenótipo ESBL, com exceção da SHV-4, SHV-11, e SHV-10, que possui fenótipo de resistência a inibidores das β -lactamases. Esta enzima mantém parcialmente sua habilidade para hidrolisar as penicilinas, porém sua atividade contra as cefalosporinas é significativamente reduzida (BRADFORD, 2001; HOWARD *et al.* 2002; STÜRENBURG & MACK, 2003).

2.1.3.3 Grupo CTX-M

A primeira CTX-M- β -lactamase (CTX-M-1) foi isolada na Alemanha em 1989, e após isso foi rapidamente disseminada entre diferentes espécies clínicas de enterobactérias, principalmente na América do Sul e, posteriormente, em diversas partes do mundo. Atualmente há mais de 50 enzimas descritas neste grupo (ALOBWEDE *et al.* 2003; QUINTEROS *et al.* 2003; STÜRENBURG & MACK, 2003; BUSH & JACOBY 2003; PITOUT *et al.* 2005; RODRIGUEZ *et al.* 2005; RYOO *et al.* 2005; CELENZA *et al.* 2006; SOGE *et al.* 2006)

Esta família de ESBL mediadas por plasmídios hidrolisa preferencialmente a cefotaxima e é encontrada principalmente em cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e *E. coli*, além de outras *Enterobacteriaceae*, em diversas partes do mundo. Apresentam apenas 40% de identidade com as β -lactamases TEM e SHV. Foram originadas provavelmente a partir da enzima cromossômica AmpC de *Kluyvera ascorbata*, uma vez que possuem alto grau de homologia entre si (BRADFORD, 2001; BONNET 2004).

As CTX-M- β -lactamases hidrolisam mais efetivamente a cefalotina e a cefaloridina que a benzilpenicilina. A capacidade dessas enzimas hidrolisarem a ceftazidima não é suficiente para promover a resistência clínica do microrganismo em que se encontram. Outra característica importante é que essas enzimas são inibidas mais efetivamente pelo tazobactam que pelo sulbactam e clavulanato (BRADFORD, 2001).

O resíduo do aminoácido serina na posição 237 está presente em todas as CTX-M- β -lactamases e tem papel fundamental em sua atividade de amplo espectro.

O resíduo de arginina na posição 276 (Arg-276), em uma posição equivalente à Arg-244 nas ESBL do tipo TEM e SHV, também deve ter papel importante na hidrólise das oximino-cefalosporinas (BRADFORD, 2001; BONNET 2004).

2.1.3.4 Grupo OXA

As OXA-ESBL diferem das enzimas TEM e SHV por pertencerem à classe molecular D (oxacilinases), grupo funcional 2d, e por serem mais comumente encontradas em cepas de *P. aeruginosa* que nas enterobactérias (DANEL *et al.* 2005; BRADFORD, 2001; CHANAWONG *et al.* 2001; STÜRENBURG & MACK, 2003; PFALLER & SEGRETI 2006).

As OXA-ESBL conferem resistência à ampicilina e cefalotina, têm alta atividade hidrolítica contra a oxacilina, cloxacilina e meticilina, e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico (BRADFORD, 2001; STÜRENBURG & MACK, 2003).

Muitas OXA-ESBL são derivadas da OXA-10 (OXA-11,-13,-14,-16,-17,-19,-28 e -35), tendo sempre uma das seguintes substituições de aminoácido: asparagina por serina na posição 73 ou aspartato por glicina na posição 157, sendo esta última necessária para o alto nível de resistência à ceftazidima (BRADFORD, 2001; STÜRENBURG & MACK, 2003).

Ao contrário das demais OXA-ESBL, o tipo OXA-17 confere resistência à cefotaxima e ceftriaxona, e apenas uma fraca proteção contra a ceftazidima (BRADFORD, 2001).

Apesar dos poucos relatos sobre o isolamento de OXA-ESBL, não se deve esquecer que os genes codificadores destas enzimas têm localização plasmidial e/ou

em transposons, o que permite sua ampla distribuição (STÜRENBURG & MACK, 2003).

2.1.3.5 Grupo PER

O grupo PER de enzimas compreende as enzimas PER-1, PER-2 e PER-3.

As enzimas PER-1 foram identificadas na Turquia, em 1991, em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, e alguns relatos da presença das mesmas em enterobactérias já foram publicados. Poirel *et al.* (2000) sugerem que a localização dos genes *bla*_{PER-1} pode ser plasmidial ou em integrons, e nestes podem estar contidos genes para os grupos OXA, VEB, e GES de ESBL, fornecendo a estes genes um meio adicional de disseminação e expressão. Pagani *et al.* (2002) descreve um surto causado por cepas de *P. mirabilis* produtoras das ESBL PER-1 na Itália, as quais foram isoladas inicialmente apenas na UTI da instituição, e após um certo período já foram identificadas em outros 15 setores, o que sugere uma alta capacidade de disseminação dos genes *bla*_{PER-1} (DANEL *et al.* 1995; BAUERFEIND *et al.* 1996; WELDHAGEN *et al.* 2003).

As enzimas PER-2 foram identificadas em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, na Argentina, em 1996. Já foram detectadas também em *Acinetobacter baumannii* e nas enterobactérias *K. pneumoniae* e *E. coli*. Atualmente só há relatos da presença dos genes *bla*_{PER-2} em países da América do Sul (BAUERFEIND *et al.* 1996; BRADFORD, 2001; QUINTEROS *et al.* 2003; CELENZA *et al.* 2006).

A ESBL PER-3 foi identificada em *Aeromonas caviae*, por Neuwirth e Siebor (2004) (BUSH e JACOBY 2003).

2.1.3.6 Grupo VEB

Este grupo de ESBL foi identificado na França, em 1999, em uma cepa de *E. coli* isolada de uma criança vietnamita, e portanto recebeu o nome de *Vietnamese Extended-Spectrum β -Lactamase* (VEB) (POIREL *et al.* 1999).

Os genes *bla*_{VEB} possuem uma significativa semelhança com *bla*_{PER-1} e *bla*_{PER-2}, porém as proteínas entre si possuem apenas 38% de homologia. É a primeira ESBL da classe A que é parte de um cassete de genes, localizado em um integron de classe A. Além disso, *bla*_{VEB-1} foi identificado em um grande plasmídio de *K. pneumoniae*, do mesmo paciente vietnamita, que o adquiriu por transferência horizontal (conjugação) (POIREL *et al.* 1999; CHANAWONG *et al.* 2001).

As ESBL PER-1, PER-2 e VEB-1 são todas relacionadas entre si, porém com apenas 40 a 50% de homologia. São originadas provavelmente a partir das cefalosporinases cromossômicas de *Bacteroides* spp. Todas conferem resistência às oximino-cefalosporinas (principalmente ceftazidima) e ao aztreonam. VEB-1, GES-1 e PER-1 possuem perfil de resistência e inibição por clavulanato semelhantes, e devido à sua localização em integrons, podem estar associadas a um cassete de genes (BRADFORD, 2001; WELDHAGEN *et al.* 2003; KIM *et al.* 2004).

2.1.3.7 Grupo GES

As ESBL do tipo GES-1 foram identificadas em uma cepa de *K. pneumoniae*, na Guiana Francesa, sendo denominada *Guiana Extended-Spectrum β -Lactamase* (GES-1). Estas enzimas se mostraram ativas contra a cefamicina cefoxitina, que em geral é ativa contra enzimas ESBL. Os genes *bla*_{GES-1}, assim como no grupo VEB,

podem estar localizados tanto em plasmídios como em integrons, constituindo uma forma a mais de disseminação e expressão. É um grupo incomum de enzimas, não relacionadas a nenhuma β -lactamase mediada por plasmídio, tendo porém 36% de homologia com a carbecilina do *Proteus mirabilis* (POIREL *et al.* 2000; BRADFORD 2001; KIM *et al.* 2004; KYOO *et al.* 2005; PFALLER & SEGRETÍ 2006).

Neste grupo de ESBL também estão as enzimas GES-2, isolada em *P. aeruginosa* na África do Sul e resistente ao imipenem, e GES-3, isolada na Grécia em *E. coli*. Na América do Sul, há relatos da detecção de genes *bla*_{GES} apenas em *P. aeruginosa* (CASTANHEIRA *et al.* 2004; KYOO *et al.* 2005; PASTERÁN *et al.* 2005).

A variedade de enzimas β -lactamases com amplo espectro de especificidade para os substratos explica muito bem o fato de que, juntas, constituem o mecanismo de resistência mais importante de bacilos Gram negativos. São capazes de hidrolisar a maioria dos compostos β -lactâmicos utilizados atualmente (Quadro 2), sendo portanto um grande problema clínico. Sua especificidade para substratos é muito ampla, incluindo quase todas as penicilinas, cefalosporinas (exceto cefamicinas) e monobactâmicos. As cepas produtoras de ESBL podem parecer sensíveis, *in vitro*, a alguns destes substratos, mas resultam, em falha terapêutica quando os mesmos são utilizados *in vivo* (GNIADKOWSKI 2001; HERNÁNDEZ *et al.* 2005; RAMPHAL & AMBROSE 2006).

2.1.4 Hidrólise de Antimicrobianos

As enzimas ESBL contêm um número de mutações que as permitem hidrolisar antimicrobianos de amplo espectro. Ligam-se covalentemente com o sítio

carbonila do anel β -lactâmico e inativam a molécula por hidrólise de sua ligação amida (FORBES *et al.* 1998; KONEMAN *et al.* 2001).

Enquanto que as ESBL TEM e SHV possuem habilidade para hidrolisar as penicilinas, não são tão eficientes cataliticamente quanto as suas enzimas de origem, TEM-1 e SHV-1. Além disso, a expansão do sítio ativo que permite a atividade aumentada contra as cefalosporinas de amplo espectro pode resultar em sensibilidade aumentada aos inibidores das β -lactamases (BRADFORD 2001; GNIADKOWSKI 2001).

As enzimas mais freqüentes em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli* conferem alto grau de resistência à ampicilina, ticarcilina e cefalotina, e sensibilidade reduzida ao aztreonam e às oximino-cefalosporinas, como cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima (KONEMAN *et al.* 2001).

A maioria das enzimas ESBL são derivadas dos tipos clássicos de β -lactamases TEM e SHV, com maior atividade contra ceftazidima que contra cefotaxima. Já o tipo CTX-M de ESBL (cefotaximase) tem alto nível de resistência à cefotaxima e baixa atividade contra ceftazidima (COQUE *et al.* 2002; SABATÉ *et al.* 2002; DAOUD & HAKIME 2003).

As ESBL não são ativas contra as cefamicinas (cefotetan e cefoxitina), porém, já há relatos de cepas ESBL positivas resistentes a estas drogas devido à perda de uma proteína porina da membrana celular externa. As enzimas do grupo GES-1 foram descritas como ativas contra a cefoxitina (BRADFORD 2001; KYOO *et al.* 2005; PFALLER & SEGRETÍ 2006).

2.1.5 Detecção e Identificação

A detecção das ESBL se dá através de métodos fenotípicos de triagem e confirmação da presença ou ausência das enzimas. A identificação dos grupos de ESBL é feita através de métodos moleculares como PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) e seus derivados, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), SSCP (*Single-strand Conformational Polymorphism*); Oligotipagem; LCR (Reação em Cadeia de Ligase); Hibridização e Sequenciamento (JARLIER *et al.* 1988; BRADFORD 2001; KONEMAN *et al.* 2001; COQUE *et al.* 2002; SABATÉ *et al.* 2002; DAOUD & HAKIME 2003; NCCLS 2003a,b; SAMAHA-KFOURY e ARAJ 2003; STÜRENBURG e MACK 2003; TENOVER *et al.* 2003; SHAH *et al.* 2004).

A PCR possibilita a amplificação de seqüências de DNA através da utilização de iniciadores específicos (*primers*). Permite a replicação, *in vitro*, de uma seqüência definida do DNA, sendo esta amplificada de forma exponencial e possível de ser visualizada após uma eletroforese (MATTE 1996; MATTE 2003).

A técnica de PFGE, segundo Matté (2003) e Martins-Loureiro *et al.* (2001) é uma das mais utilizadas em estudos epidemiológicos. Em surtos hospitalares é necessário a descoberta da fonte de infecção e da relação genética entre as cepas isoladas, a qual pode ser feita através da eletroforese em campo pulsado, capaz de revelar padrões de bandas específicos para cada cepa bacteriana após a utilização de enzimas que fragmentam determinadas regiões do DNA (MATTE 2003).

Tosin *et al.* (2003) em um estudo epidemiológico em hospitais brasileiros (integrado ao programa internacional de vigilância SENTRY), avaliaram a técnica de PFGE para a caracterização genotípica de bacilos Gram negativos. O método, segundo os autores, fornece informações únicas sobre o perfil molecular das cepas,

podendo ser muito útil na determinação da disseminação clonal e da fonte de infecção em caso de ocorrência de surtos.

Tenover *et al.* (1995) descreve uma metodologia simplificada de agrupamento de perfis moleculares gerados por PFGE, para facilitar a investigação de pequenos surtos hospitalares.

2.2. ESBL e Infecção Hospitalar

As ESBL são mundialmente reconhecidas como um problema para pacientes hospitalizados. Nos últimos anos, a frequência de ESBL aumentou muito em todo o mundo, sendo hoje um dos maiores problemas terapêuticos em muitas instituições. Os surtos normalmente se iniciam na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e se disseminam pelo hospital por vias tradicionais, como contato com profissionais da instituição e/ou fômites contaminadas (BRADFORD 2001; DAOUD & HAKIME 2003; SAMAHA-KFOURY e ARAJ 2003; STÜRENBURG e MACK 2003).

As cepas produtoras de ESBL e/ou seus genes codificadores das enzimas são capazes de se estabelecer permanentemente nos hospitais, produzindo surtos de infecção e de colonização, principalmente em setores onde os pacientes possuem um alto nível de comprometimento imunológico, debilidade e manipulação, além do uso excessivo de antimicrobianos de amplo espectro. Isto ocorre devido à localização dos genes para ESBL em plasmídios ou em transposons, que são facilmente transferíveis entre cepas por conjugação (BRADFORD 2001; GNIADKOWSKI 2001; COQUE *et al.* 2002; SABATÉ *et al.* 2002; DAOUD & HAKIME 2003; STÜRENBURG e MACK 2003).

A disseminação das ESBL é facilitada por diversos aspectos, como a diversidade de β -lactamases relacionadas diretamente entre si na sua evolução, a prevalência mundial de seus tipos específicos, a facilidade relativa do surgimento de uma ESBL, a mobilidade de seus genes e a forte pressão seletiva do uso indiscriminado dos antimicrobianos (KLIEBE *et al.* 1985; GNIADKOWSKI 2001; PEÑA *et al.* 2001; DAOUD & HAKIME 2003; LI *et al.* 2003).

Cavassin (2003), após um levantamento bibliográfico entre 1990 e 2003, conclui que 17% dos pacientes atingidos por infecções hospitalares são de UTI, número que se eleva para 30% em neonatos. Em seu estudo, descreve um surto por *Klebsiella pneumoniae* em uma UTI neonatal, que se estende por sete meses, até sua erradicação após medidas de prevenção de contato.

Mesmo havendo atualmente uma grande “corrente” de conscientização quanto ao uso racional dos antimicrobianos e às boas práticas de higiene no ambiente hospitalar entre profissionais da saúde, o grande número de publicações descrevendo surtos, colonizações prolongadas em pacientes internados e casos de infecções na comunidade por bactérias multi-resistentes, mostra que estas situações ocorrem com muita frequência e podem evoluir para situações endêmicas complexas, com uma grande variedade de cepas expressando combinações múltiplas de mecanismos de resistência.

2.3. Colonizações, Surtos e Infecções

As infecções invasivas por cepas produtoras de ESBL estão relacionadas provavelmente à colonização prévia e formação de biofilme. A colonização por cepas multi-resistentes é considerada um pré-requisito para a infecção, e na vigência

de surtos ou para fins de pesquisa deve ser investigada inclusive em pessoas saudáveis. O aumento da proporção de portadores destas cepas aumenta o risco de outros indivíduos se tornarem portadores como consequência da transmissão ambiental ou de pessoa para pessoa. Bagattini *et al.* (2006), em um estudo da epidemiologia molecular de *K. pneumoniae* em uma UTI Neonatal na Itália, identificaram o clone de um surto em amostras ambientais e em um dos servidores da instituição (VALVERDE *et al.* 2004).

Mesmo em UTI neonatais, apesar dos pacientes não possuírem microflora intestinal ao nascerem e a desenvolverem mais lentamente, espécies de *Klebsiella* têm sido altamente prevalentes como colonizadoras, produtoras de ESBL e causadoras de infecções (BRADFORD 2001; MARTINS-LOUREIRO *et al.* 2001; STÜRENBURG & MACK 2003; DAOUD & HAKIME 2003).

No estudo de Pessoa-Silva *et al.* (2003), dos 13 neonatos infectados por *K. pneumoniae* ESBL positivas, 12 sofreram colonização prévia por este microrganismo, e em um total de 383 neonatos, 206 foram colonizados. Segundo os autores, a probabilidade de colonização com patógenos hospitalares em UTI neonatais aumenta com o tempo: até o décimo dia de internação, 40% das crianças são colonizadas, porcentagem que sobe para 90% após um mês.

Em situações de surto ou endemias graves, uma das medidas de controle da colonização do trato digestivo por cepas ESBL-positivas é a análise periódica de amostras de swab retal dos pacientes internados, principalmente em UTI neonatais e pediátricas, e em pacientes recém admitidos no hospital.

Decré *et al.* (2004) relatam um surto por cepas de *Klebsiella oxytoca* isoladas tanto de amostras clínicas como de swab retal, produtoras de ESBL e expressando

uma superprodução de β -lactamases constitutivas do grupo OXY. Estas cepas também eram resistentes a aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfametoxazol. Técnicas moleculares (PFGE e ERIC-PCR) identificaram dois clones relacionados ao surto, sendo que um deles era responsável apenas pela produção das enzimas OXY-2, e o outro pela produção tanto da enzima cromossômica como de ESBL.

Valverde *et al.* (2004) realizaram um estudo comparando a prevalência da produção de ESBL por cepas isoladas de amostras fecais nos anos de 1991 e 2003. A instituição estudada já realizava a triagem para produção de ESBL em todas as enterobactérias isoladas desde 1987. As amostras eram de pacientes hospitalizados e ambulatoriais, coletadas em períodos em que certamente não havia surtos. Nenhum dos pacientes ambulatoriais freqüentava serviços de saúde ou eram moradores de casas de repouso. Em 1991, a prevalência de portadores de cepas ESBL era duas vezes maior na comunidade que entre pacientes internados, situação que se inverteu em 2003, em que a prevalência de portadores hospitalizados foi duas vezes maior que nos ambulatoriais. Os autores atribuem este aumento significativo no número de portadores de cepas ESBL no ambiente hospitalar à pressão seletiva do uso inadequado de drogas antibacterianas.

Há uma forte associação entre o alto consumo de antimicrobianos em uma população e a freqüência do isolamento de bactérias resistentes. Os resultados da participação do Brasil no programa SENTRY de vigilância de infecções hospitalares (1997-1999), apresentados por Sader *et al.* (2001) mostram o contraste entre as proporções de cepas de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBL no Brasil (50% e 9%, respectivamente) e nos Estados Unidos (5% e 2%, respectivamente), e Europa (15-20% para *K. pneumoniae*). Os autores ressaltam que, apesar de haver

disseminação dos genes para ESBL através de plasmídios, a grande variabilidade genética encontrada entre as cepas no Brasil sugere a seleção contínua de mutantes resistentes, devido principalmente ao uso de cefalosporinas de terceira geração.

Motta *et al.* (2003) relatam que, na América Latina, bactérias resistentes são uma ameaça a pacientes com infecções comuns na comunidade e nos hospitais. Em seu trabalho, os autores verificaram a presença de ESBL em cepas de enterobactérias isoladas de úlceras em pés de pacientes diabéticos, enfatizando que a resistência entre bactérias Gram negativas está se tornando cada vez mais comum, mesmo fora do ambiente hospitalar.

As infecções no trato urinário por enterobactérias ESBL positivas também são muito freqüentes, tanto no ambiente hospitalar como na comunidade. Segundo resultados da América Latina do programa SENTRY de 1997 a 2000, *K. pneumoniae* e *E. coli* são as espécies produtoras de ESBL mais isoladas nestas infecções, sendo ambas muito resistentes a várias classes antimicrobianas, inclusive fluoroquinolonas. Embora o programa SENTRY seja voltado para a vigilância de infecções hospitalares, neste estudo foram incluídas cepas de pacientes que haviam adquirido a infecção na comunidade e necessitaram de internação devido à gravidade da mesma (GALES *et al.* 2002).

O uso indiscriminado de antimicrobianos está entre os principais fatores de risco para a ocorrência de infecções graves e surtos hospitalares (GNIADKOWSKI 2001; LAUTENBACH *et al.* 2001; LIN *et al.* 2003).

No controle do surto descrito por Peña *et al.* (1998), causado por *K. pneumoniae* ESBL positiva, uma das medidas eficientes adotadas foi a restrição do uso de oximino-cefalosporinas, que reduziu a tendência à infecção em pacientes da

UTI. Pessoa-Silva *et al.* (2003) analisando fatores de risco para colonização e infecção por *K. pneumoniae* ESBL positiva em uma UTI neonatal, relacionaram a associação cefalosporinas/aminoglicosídeos com o aumento do risco de colonização, enquanto que a substituição destes por imipenem nos neonatos diminuiu este risco.

Em um estudo epidemiológico realizado em 15 hospitais do Brooklyn, NY, cepas de *K. pneumoniae* ESBL positivas foram analisadas através de técnicas moleculares (PCR, sequenciamento e ribotipagem automatizada). Dois grandes grupos de cepas relacionadas geneticamente pertenciam a mais de 10 hospitais, e as análises estatísticas dos dados obtidos no estudo revelaram que apenas o uso de cefalosporinas e aztreonam estava direta e estatisticamente correlacionado com a prevalência das cepas em cada hospital. Os autores consideram esta questão um problema de saúde pública, e não apenas institucional, devido à falta de prioridade das políticas de uso restrito de antimicrobianos no local (QUALE *et al.* 2002).

A importância do uso racional dos antimicrobianos se reafirma no estudo de Rodríguez-Baño *et al.* (2004) na Espanha. Os autores analisam a epidemiologia de cepas de *Escherichia coli* ESBL positivas causadoras de infecções urinárias em pacientes ambulatoriais. Uma análise multivariada dos dados obtidos revela que os fatores de risco estatisticamente significativos para a ocorrência destas infecções são, entre outros, o uso prévio de fluoroquinolonas e as internações anteriores dos pacientes. Paterson *et al.* (2000) e Bradford (2001) também observaram que freqüentemente cepas produtoras de ESBL são mais resistentes às fluoroquinolonas que as ESBL negativas, e esta relação é bastante pesquisada por outros autores (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ *et al.* 1998, 2002; PATERSON *et al.* 2000; SIROT *et al.* 2002; YU *et al.* 2002; TOLUN *et al.* 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar geneticamente cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo.

3.2 Objetivos Específicos

- Pesquisar a presença de genes codificadores da produção de diferentes grupos de ESBL nas cepas estudadas;
- Relacionar os grupos de ESBL encontrados com as espécies onde foram detectados;
- Verificar a similaridade genética entre as cepas de *Klebsiella pneumoniae* do estudo;
- Analisar os possíveis meios de disseminação de cepas de *K. pneumoniae* de acordo com seus perfis moleculares e com os genes *bla* que nelas forem detectados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP), em conjunto com o Comitê de Ensino e Pesquisa (COMEP), a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) e o Laboratório de Microbiologia Clínica de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo. O hospital caracteriza-se como instituição de ensino e pesquisa na área de saúde e assistência hospitalar de média complexidade, possuindo 258 leitos, distribuídos entre os setores: Centro Cirúrgico, Centro Obstétrico, Unidades de Terapia Intensiva Adulta, Pediátrica e Neonatal, Unidade de Terapia Semi-Intensiva, Berçário, Ambulatório, Pronto Socorro, Clínica Médica e Pediátrica.

Os critérios utilizados para classificação de casos de infecções e colonizações pela CCIH foram segundo o Manual para Prevenção das Infecções Hospitalares do hospital, baseado em padronizações internacionais (CASSETARI *et al.* 2005).

4.1 Cepas Bacterianas

As cepas utilizadas no estudo foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Clínica do hospital, no período de Julho/2004 a Junho/2005.

Foram estudadas 135 cepas de enterobactérias caracterizadas como produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) após os testes laboratoriais específicos, independentemente do tipo de amostra clínica e/ou do setor hospitalar onde foram isoladas.

O laboratório clínico forneceu também os resultados dos testes de identificação e de sensibilidade antimicrobiana realizados para cada cepa estudada. A CCIH do hospital forneceu dados referentes à internação, estada em UTI e topografia de cada caso de infecção hospitalar pelas cepas envolvidas neste estudo.

4.2 Determinação da Produção de ESBL

A triagem e a confirmação das cepas produtoras de ESBL foram realizadas através do sistema automatizado Vitek System (BioMerieux, Hazlewood, MO), que utiliza ceftazidima e cefotaxima, isoladas e associadas ao ácido clavulânico (4 µg/mL). A redução do crescimento nas lacunas contendo clavulanato comparado àquelas contendo as drogas isoladas indica a presença de ESBL (SHAH *et al.* 2004).

A confirmação também foi feita manualmente, pelo método da combinação de discos, ilustrada na Figura 3, que utiliza discos contendo: ceftazidima (30µg), ceftazidima (30µg) associada ao ácido clavulânico (10µg), cefotaxima (30µg), cefotaxima (30µg) associada ao ácido clavulânico (10µg), cefpodoxima (10µg) e cefpodoxima (10µg) associada ao ácido clavulânico (1µg). Um aumento maior ou igual a 5mm na zona de inibição do disco associado ao inibidor de β-lactamase indica produção de ESBL.

Figura 3 – método da combinação de discos em cepas de *K. oxytoca* (produtora de CTX-M-1 - ESBL), *E. coli* (produtora de TEM-52 – ESBL) e *K. pneumoniae* (produtora de SHV-18 – ESBL), respectivamente.

4.3 Extração de DNA total

A extração do DNA total foi realizada para todas as cepas de enterobactérias, segundo Chapman *et al.* (2001).

Cada cepa foi reisolada em Ágar MacConkey e incubada a 35°C por 18-24h. De cada placa, inoculou-se uma colônia em 10mL de caldo Luria 0,5% de NaCl, em tubos tipo Falcow[®], incubando-os a 35°C por 18-24h.

Os tubos foram então centrifugados a 5000rpm, a 24°C por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e as células do sedimento (*pellet*) foram ressuspensas em 1mL de água mQ[®] estéril e transferidas para um microtubo tipo eppendorf[®].

Os microtubos foram centrifugados a 12000rpm, a 24°C por 3min. Cada sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em 200μL de água mQ[®] estéril.

A suspensão foi então submetida ao banho de água a 95°C, por 10 minutos, e em seguida colocada em freezer a -20°C, por 30 minutos. Os microtubos foram então retirados do freezer e colocados em repouso em temperatura ambiente até o descongelamento.

Os microtubos foram centrifugados a 12000rpm, a 24°C por 10min e o sobrenadante contendo o material genético transferido para um novo tubo de eppendorf®. Os tubos contendo o DNA foram armazenados em freezer a -20°C.

4.4 Identificação dos grupos de ESBL pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Foram pesquisados os grupos de ESBL **TEM, SHV, CTX-M, OXA, PER, VEB e GES**. Toda a técnica realizada, bem como os pares de iniciadores (*primers*) utilizados (Quadro 4), foram baseados na metodologia descrita por Cao *et al.* (2002), com modificações. Apenas o par de iniciadores para pesquisa do gene *bla_{PER-2}* foi utilizado segundo Bauerfeind *et al.* 1996.

Foram utilizados controles positivos gentilmente cedidos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP) e pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), além de cepas da *Americam Type Culture Colection* (ATCC).

Cada microtubo de reação continha um volume total de 25µL, nos quais havia os seguintes reagentes nas respectivas concentrações: DNA total 25ng, tampão 1X sem Mg, MgCl₂ 1,5mM, dntp 200µM, iniciadores 50pmol cada, e Taq-DNA-polimerase 2U.

Em um termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf), a reação ocorreu com uma denaturação inicial a 94°C por 2 min., seguida de 30 ciclos consistindo de: denaturação a 94°C por 45s, anelamento a 52°C por 1 min., e extensão a 72°C por 1minuto. Após a finalização dos ciclos, houve uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR, juntamente com um marcador de peso molecular (100bp MassRuler™ DNA Ladder, Fermentas), foram submetidos a uma eletroforese a 6V/cm em gel de agarose a 1,8%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems).

Quadro 4 – Sequência de iniciadores para a detecção dos genes *bla*.

GENES	SEQUÊNCIA 5'-3'	POSIÇÃO	Fonte	Controle Positivo
<i>Bla</i> _{TEM}	TCGGGGAAATGTGCGCG TGCTTAATCAGTGAGGCACC	90-105 1042-1062	Cao <i>et al.</i> 2002	<i>K. pneumoniae</i> ; TEM-3 FCF-USP
<i>bla</i> _{SHV}	TTATCTCCCTGTTAGCCACC GATTTGCTGATTTCGCTCGG	23-42 799-818	Cao <i>et al.</i> 2002	<i>K. pneumoniae</i> ; SHV-18 FCF-USP
<i>bla</i> _{CTX-M}	SCSATGTGCAGYACCAGTAA CCGCRATATGRTTGGTGGTG	270-289 794-813	Cao <i>et al.</i> 2002	<i>E. coli</i> FCF-USP
<i>bla</i> _{OXA-10}	TTAGGCCTCGCCGAAGCG CTTTGTTTTAGCCACCAATGATG	7331-7348 8297-8319	Cao <i>et al.</i> 2002	Não
<i>bla</i> _{PER-1}	ATGAATGTCATTATAAAAGC AATTTGGGCTTAGGGCAGAA	309-328 1233-1214	Cao <i>et al.</i> 2002	Não
<i>bla</i> _{PER-2}	CGCTTCTGCTCTGCTGAT GGCAGCTTCTTTAACGCC	307-324 758-775	Bauerfeind <i>et al.</i> , 1996	<i>E. aerogenes</i> (FCF-USP)
<i>bla</i> _{VEB-1}	CGACTTCCATTTCCCGATGC GGACTCTGCAACAAATACGC	128-151 1198-1180	Cao <i>et al.</i> 2002	Não
<i>bla</i> _{GES-1}	ATGCGCTTCATTACGCAC CTATTTGTCCGTGCTCAGG	1322-1340 2095-2077	Cao <i>et al.</i> 2002	<i>P. aeruginosa</i> 2663 (UNIFESP)

4.5 Comparação genética entre as cepas de *Klebsiella pneumoniae* por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE foi realizada para as 95 cepas identificadas como *Klebsiella pneumoniae* produtoras de enzimas ESBL, uma vez que foi a espécie isolada em maior quantidade no hospital no período estudado.

O procedimento foi baseado na metodologia descrita pelo *Center for Diseases Control* (CDC) (2004). Esta técnica foi descrita para cepas de outras enterobactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella* e *Shigella sonnei*), e algumas modificações foram necessárias para adaptá-la às cepas de *K. pneumoniae*.

A cepa ATCC 13883 de *K. pneumoniae*, fornecida pela Coleção de Cultura do Instituto Adolfo Lutz (IAL 1920), foi utilizada como controle positivo para esta técnica.

4.5.1. Preparo do plug

As cepas foram reisoladas em ágar MacConkey (MC) e incubadas a 35°C por 18-24h. Uma única colônia de cada cepa foi então semeada em 30mL de caldo Luria a 0,5% de NaCl, e incubada novamente a 35°C por 18-24h.

As culturas foram então centrifugadas a 5000RPM por 15 minutos, em temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 1mL de solução tampão TE I (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 1mM, pH 8,0) e transferidas para microtubos tipo eppendorf®, os quais foram centrifugados a 12000RPM por 5 minutos a 24°C.

Adicionou-se então às células 400μL de TE I, e desta suspensão, 80μL foram adicionados a 320μL de agarose para Pulsed Field a 1%, a 55-60°C. Em seguida, os

moldes (3 por amostra) para confecção dos *plugs* foram preenchidos e incubados por 15 minutos a 4°C, para solidificação.

4.5.2. Extração de DNA Genômico

Os *plugs* foram então retirados dos moldes e colocados em 5mL de uma solução de lise (EDTA 50mM, pH8,0; Tris-HCl 50mM, pH 7,5; SDS 20%, Sarkosyl 1%, proteinase K 20mg/mL), em tubos tipo Falcow[®], e incubados a 55°C por 2h.

Após a incubação, foram realizadas 2 lavagens dos *plugs* em 10mL de água mQ[®] e 4 lavagens em 10mL de TE I (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 1mM, pH8,0), com intervalos de 15min, a 55°C.

Os *plugs* foram então transferidos para um microtubo tipo Eppendorf[®] e estocados em 1mL de TE I a 4°C, até o momento do uso.

4.5.3. Digestão Enzimática

A enzima de restrição utilizada foi a *XbaI*, que fornece fragmentos de restrição com peso molecular adequado para a corrida eletroforética e para a visualização dos perfis moleculares das cepas estudadas (MARTINS-LOUREIRO *et al.* 2001; XIONG *et al.* 2002, GRUTEKE *et al.* 2003; PESSOA-SILVA *et al.* 2003; CARTELLE *et al.* 2004).

Para este procedimento foi utilizado apenas um *plug* por amostra. Cada *plug* foi transferido para um novo microtubo e neste adicionou-se 300µL do tampão específico da enzima *XbaI*, diluído de 10X para 1X, segundo instruções do fabricante. Os tubos foram então incubados em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após este período, retirou-se o tampão da enzima e adicionou-se 300µL de uma

solução contendo novo tampão da enzima 1X, albumina bovina acetilada (BSA) 0,01% e 10U de *Xba*I, e as amostras foram incubadas a 37°C por 18h.

4.5.4. Eletroforese em Campo Pulsado

Após a digestão pela enzima *Xba*I, os fragmentos de restrição foram submetidos à eletroforese em campo pulsado (Chef Mapper (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Em um gel de agarose para *Pulsed Field* a 1% em solução tampão TBE 0,5X (Tris-borato 45mM, EDTA dissódico 1mM, pH 8,0), foram colocados os *plugs* das amostras e de 1 marcador de peso molecular (multimeric phase lambda DNA ladder 48, 5Kb, Bio-Rad).

As condições utilizadas na eletroforese foram: voltagem de 6V/cm, a 14°C, por 20h, com intervalo de pulsos de 3,51s a 30,82s.

4.5.5. Visualização

O gel de PFGE foi corado em brometo de etídio 1µg/mL, durante 1h, e visualizado em luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems).

4.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.6.1 PCR

As imagens dos géis, capturadas em sistema para aquisição de imagem (Epi Chemi II Darkroom e LabWorks Software, UVP Bioimaging Systems, Upland, CA), foram analisadas visualmente. Os grupos de ESBL foram identificados pelo peso molecular dos produtos da reação de PCR, o qual será estimado após a comparação com a imagem do marcador de peso molecular utilizado (MATTÉ 2003).

4.6.2 PFGE

Após a captação das imagens dos géis de PFGE (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems), o polimorfismo das bandas geradas pela eletroforese foi analisado primeiramente segundo Tenover *et al.* 1995, para o agrupamento de perfis similares. Após este agrupamento, os perfis de fragmentos de DNA observados foram analisados no programa GelWorks 1D Advanced – UVP, versão 4.01 e GelWorks 1D Database versão 1.12 – UVP Bioimaging Systems, Upland, CA.

Os perfis foram agrupados segundo o coeficiente de similaridade de Dice e demonstrados graficamente em dendrogramas (MATTÉ 2003).

5. RESULTADOS

5.1 Cepas Bacterianas

No período estudado (Julho/2004 a Junho/2005), foram isoladas, de amostras clínicas de 92 pacientes, 135 cepas de enterobactérias produtoras de ESBL, sendo 97 (71,9%) *Klebsiella pneumoniae*, 18 (13,3%) *Escherichia coli*, 8 (5,9%) *Morganella morganii*, 4 (3,0%) *Proteus mirabilis*, 2 (1,5%) *Klebsiella oxytoca*, 2 (1,5%) *Providencia rettgeri*, 2 (1,5%) *Providencia stuartii*, 1 (0,7%) *Enterobacter aerogenes* e 1 (0,7%) *Enterobacter cloacae*. Segundo avaliação da CCIH do hospital, 82 (61,6%) casos foram de colonização pela cepa isolada, 19 (14,3%) foram infecções comunitárias ou não relacionadas à instituição, e 32 (24,1%) foram consideradas infecções hospitalares. Dos casos de colonização, 55 (40,7%) eram provenientes de amostras de rotina e 27 (20%) de culturas de vigilância.

Os setores do hospital onde as cepas foram obtidas são: Ambulatório, Pronto Socorro (PS), Clínica Cirúrgica, Clínica Médica, Clínica Pediátrica, Unidades de Terapia Intensiva (UTI) Adulta, Neonatal e Pediátrica, Unidade de Terapia Semi-Intensiva (SEMI) e Berçário. O número e a porcentagem de cepas isoladas em cada setor estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 – Número e porcentagem de espécies da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL nos setores do hospital, Julho/2004 a Junho/2005.

ESPÉCIE	<u>SETOR</u>										Total
	Ambulatório	PS	Clínica Cirúrgica	Clínica Médica	Clinica Pediátrica	UTI Adulta	UTI Neonatal	UTI Pediátrica	SEMI	Berçário	
	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)
<i>K. pneumoniae</i>	5 (3,7)	3 (2,2)	1 (0,7)	8 (6,0)	4 (3,0)	7 (5,2)	13 (9,6)	7 (5,2)	3 (2,2)	46 (34,1)	97 (71,8)
<i>E. coli</i>	2 (1,5)	1 (0,7)	5 (3,7)	4 (3,0)	1 (0,7)	3 (2,2)	0 (0)	2 (1,5)	0 (0)	0 (0)	18 (13,3)
<i>M. morgani</i>	3 (2,2)	3 (2,2)	0 (0)	1 (0,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,7)	8 (6,0)
<i>P.mirabilis</i>	0 (0)	2 (1,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,7)	0 (0)	0 (0)	1 (0,7)	0 (0)	4 (3,0)
<i>K. oxytoca</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,7)	1 (0,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1,5)
<i>P. rettgeri</i>	1 (0,7)	1 (0,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1,5)
<i>P. stuartii</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1,5)
<i>E. aerogenes</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,7)
<i>E. cloacae</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,7)	0 (0)	0 (0)	1 (0,7)
Total	11 (8,1)	10 (7,4)	6 (4,4)	13 (9,6)	6 (4,4)	15 (11,1)	13 (9,6)	10 (7,4)	4 (3)	47 (34,8)	135 (100)

5.2 Identificação dos Grupos de ESBL pela PCR

A identificação dos grupos de ESBL produzidas pelas cepas deste estudo foi realizada pela PCR, com iniciadores específicos. Todas as 135 cepas tiveram seu DNA total extraído para a pesquisa da presença dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{GES}*, *bla_{VEB}*, *bla_{OXA}*, *bla_{PER-1}* e *bla_{PER-2}*.

A presença do gene *bla_{SHV}* foi detectada em 81 (60,0%) cepas, sendo 71 (87,7%) *Klebsiella pneumoniae*, 4 (4,9%) *Escherichia coli*, 2 (2,5%) *Morganella morganii*, 2 (2,5%) *Proteus mirabilis*, 1 (1,2%) *Providencia rettgeri*, e 1 (1,2%) *Enterobacter cloacae*.

O gene *bla_{TEM}* foi detectado em 23 (17,0%) cepas, sendo 16 (69,6%) *K. pneumoniae*, 3 (13,0%) *E. coli*, 2 (8,7%) *P. mirabilis*, 1 (4,35%) *M. morganii*, e 1 (4,35%) *Klebsiella oxytoca*.

O gene *bla_{CTX-M}* estava presente em 44 (32,6%) cepas: 24 (54,5%) *K. pneumoniae*, 8 (18,2%) *E. coli*, 5 (11,4%) *M. morganii*, 3 (6,8%) *P. mirabilis*, 2 (4,5%) *Providencia stuartii*, 1 (2,3%) *K. oxytoca*, e 1 (2,3%) *Enterobacter aerogenes*.

Detectou-se a presença do gene *bla_{GES}* em 4 (3,0%) cepas: 3 (75%) *P. mirabilis* e 1 (25%) *K. pneumoniae*. O gene *bla_{VEB}* foi encontrado em 6 (4,4%) cepas destas mesmas espécies: 5 (83,3%) *K. pneumoniae* e 1 (16,7%) *P. mirabilis*. 11 (8,1%) cepas apresentavam o gene *bla_{PER-2}*, sendo 8 (72,7%) *K. pneumoniae*, 2 (18,2%) *P. stuartii*, e 1 (9,1%) *E. coli*.

Os genes *bla_{OXA}* e *bla_{PER-1}* não foram detectados nas cepas estudadas. Em 25 (18,5%) cepas nenhum dos genes pesquisados foi identificado.

Os genes presentes em cepas de pacientes do **Ambulatório** foram: *bla_{SHV}* em *K. pneumoniae*, *E. coli*, *M. morganii* e *P. rettgeri*; *bla_{TEM}* em *K. pneumoniae*; e *bla_{CTX-M}* em *K. pneumoniae*, *M. morganii* e *E. coli*. No **Pronto Socorro** os isolados continham os genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* em *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*; *bla_{CTX-M}* em *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis* e *M. morganii*; e *bla_{GES}* e *bla_{VEB}* em *P. mirabilis*.

Nas cepas da **Clínica Cirúrgica** detectou-se os genes *bla_{SHV}* em *E. coli* e *K. pneumoniae*, e *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}* apenas em *E. coli*. No setor de **Clínica Médica**, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}* foram detectados em *K. pneumoniae*, *E. coli* e *M. morganii*; *bla_{SHV}* foi encontrado em *K. pneumoniae* e *E. coli*; e *bla_{VEB}* em *K. pneumoniae*. Na **Clínica Pediátrica**, os genes encontrados foram *bla_{SHV}* em *K. pneumoniae*, *bla_{TEM}* em *K. oxytoca* e *bla_{CTX-M}* em *K. pneumoniae* e *E. coli*.

Nos isolados de pacientes da **UTI Adulta**, foram detectados os genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* em *K. pneumoniae*; *bla_{CTX-M}* em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *E. aerogenes* e *P. stuartii*; *bla_{GES}* em *K. pneumoniae*; e *bla_{PER-2}* em *P. stuartii*. Na **UTI Neonatal**, onde só foram isoladas cepas de *K. pneumoniae*, detectou-se a presença dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{VEB}* e *bla_{PER-2}*. Na **UTI Pediátrica** os genes observados foram: *bla_{SHV}* em *K. pneumoniae*, *E. coli* e *E. cloacae*; *bla_{TEM}* em *K. pneumoniae* e *E. coli*; *bla_{CTX-M}* em *K. pneumoniae* e *E. cloacae*; e *bla_{PER-2}* em *K. pneumoniae* e *E. coli*.

No **Berçário**, foram isoladas 46 cepas de *K. pneumoniae* e 1 de *M. morganii*. Nas cepas de *K. pneumoniae*, os genes detectados foram: *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{VEB}* e *bla_{PER-2}*. Cada cepa apresentou até 4 destes genes em seu DNA total. Na cepa de *M. morganii* detectou-se a presença do gene *bla_{CTX-M}*.

Na Figura 4 são observados exemplos de cepas positivas para os genes *bla* nas espécies de *Enterobacteriaceae*. A tabela 2 apresenta a distribuição em número e porcentagem de cepas em que se detectou cada um dos genes *bla*, nos diferentes setores do hospital.

Figura 4 – Exemplos da detecção de genes *bla* em algumas espécies da família *Enterobacteriaceae*. Linhas 1 e 10, 100bp MassRuler™ DNA Ladder, Fermentas; Linha 2, *bla*_{SHV} em *K. pneumoniae*; Linha 3, *bla*_{TEM} em *K. pneumoniae*; Linha 4, *bla*_{TEM} em *P. mirabilis*; Linha 5, *bla*_{CTX-M} em *P. mirabilis*; Linha 6, *bla*_{CTX-M} em *K. pneumoniae*; Linha 7, *bla*_{GES} em *P. mirabilis*; Linha 8, *bla*_{GES} em *K. pneumoniae*; Linha 9, *bla*_{PER-2} em *P. stuartii*; Linha 11, *bla*_{VEB} em *K. pneumoniae*.

Tabela 2 – Distribuição em número e porcentagem de cepas contendo genes *bla* para grupos de ESBL, Julho/2004 a Junho/2005.

Grupo de ESBL	<u>SETOR</u>									
	Ambulatório	PS	Clínica Cirúrgica	Clínica Médica	Clinica Pediátrica	UTI Adulta	UTI Neonatal	UTI Pediátrica	SEMI	Berçário
	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	N° (%)	n° (%)
SHV	9 (82)	4 (40)	2 (33)	7 (54)	3 (50)	6 (40)	11 (85)	8 (80)	1 (25)	30 (64)
TEM	1 (9)	3 (30)	1 (17)	5 (38)	1 (17)	2 (13)	4 (31)	2 (20)	1 (25)	2 (4)
CTX-M	3 (27)	6 (60)	2 (33)	7 (54)	3 (50)	12 (80)	1 (8)	3 (30)	2 (50)	6 (12)
GES	0 (0)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1(7)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)
VEB	0 (0)	1 (10)	0 (0)	2 (15)	0 (0)	0 (0)	2 (15)	0 (0)	0 (0)	1 (2)
PER-2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (13)	4 (31)	2 (20)	0 (0)	3 (6)
Não Identificado	3 (27)	2 (20)	2 (33)	2 (15)	1 (17)	2 (13)	1 (8)	1 (10)	1 (25)	10 (22)

5.3 Comparação genética entre as cepas de *Klebsiella pneumoniae* por PFGE

No presente estudo, das 135 cepas produtoras de ESBL estudadas, 97 (71,9%) eram de *Klebsiella pneumoniae*, e estas tiveram seus perfis moleculares analisados e comparados após a realização da técnica de PFGE.

Foram identificados 8 perfis genéticos principais, PF 1 a PF 8, em 68 (70,1%) cepas, os quais apresentaram similaridade mínima de 78%. O dendrograma apresentado na Figura 5 apresenta a relação entre estes perfis, com o respectivo número de cepas apresentando cada padrão molecular.

As outras 29 (29,8%) cepas apresentaram perfis diversos, como pode ser observado nos exemplos da Figura 6.

As cepas do Berçário do hospital apresentaram 11 perfis distintos, PF 1 a PF 8, e três perfis isolados. A análise em separado de todos estes padrões foi realizada, resultando no dendrograma da Figura 7.

Figura 5 – Representação gráfica da matriz de similaridade de Dice, dos perfis obtidos por meio de PFGE em cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL isoladas na instituição, no período de Julho de 2004 a Junho de 2005. *n = número de cepas apresentando cada padrão molecular.

Figura 6 – PFGE - exemplos de cepas de *K. pneumoniae* apresentando perfis distintos. Cepas 8, 32, 53, 59, 64, 69 e 110 provenientes da Unidade de Terapia Intensiva; cepas 2 e 37 provenientes da Unidade de Terapia Semi-Intensiva. São Paulo, Julho de 2004 a Junho de 2005.

Figura 7 – Representação gráfica da matriz de similaridade de Dice, dos perfis obtidos por meio de PFGE cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL, isoladas no Berçário do hospital, no período de Agosto de 2004 a Fevereiro de 2005. As cepas 47, 78 e 86 pertencem a perfis moleculares isolados. *n = número de cepas apresentando cada padrão molecular.

Ocorrência dos perfis moleculares nos setores do hospital

Cada perfil molecular foi observado em até 5 setores do hospital, como se pode observar na Tabela 3. As Figuras 8a e 8b apresentam os períodos em que estas cepas foram isoladas.

Os diferentes setores da instituição apresentaram de 0 a 8 dos perfis analisados e denominados PF 1 a PF 8. Na UTI Adulta, Clínica Médica, Clínica Cirúrgica e Unidade de Terapia Semi-Intensiva, apenas perfis isolados foram identificados.

Tabela 3 - Distribuição em número e porcentagem de cepas de *K. pneumoniae* e respectivos perfis moleculares por setor do hospital, de Julho/2004 a Junho/2005.

Setores	PF 1	PF 2	PF 3	PF 4	PF 5	PF 6	PF 7	PF 8	Perfis Isolados	TOTAL
	n° (%)	N° (%)	N° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)
Berçário	9 (9,3)	3 (3,1)	5 (5,1)	10 (10,3)	7 (7,2)	6 (6,2)	2 (2,1)	1 (1)	3 (3,1)	46 (47,4)
Ambulatório	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	4 (4,1)	6 (6,2)
PS	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (3,1)	4 (4,1)
UTI Neonatal	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2,1)	3 (3,1)	5 (5,1)	1 (1)	1 (1)	12 (12,4)
UTI Adulta	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (7,2)	7 (7,2)
UTI Pediátrica	2 (2,1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	3 (3,1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	7 (7,2)
Clínica Médica	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (7,2)	7 (7,2)
Clínica Cirúrgica	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
Clínica Pediátrica	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (4,1)
SEMI	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (3,1)	3 (3,1)
TOTAL	12 (12,4)	5 (5,1)	5 (5,1)	12 (12,4)	9 (9,3)	15 (15,5)	8 (8,2)	2 (2,1)	29 (29,9)	97 (100)
<i>n° de Pacientes</i>	10	4	4	10	8	5	5	2	21	69

Berçário

O aparecimento de isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL em pacientes do Berçário a partir de agosto de 2004 levou a CCIH da instituição a suspeitar da ocorrência de um surto. Iniciou-se então em novembro do mesmo ano a coleta periódica de amostras de swab anal de todos os pacientes do setor, para cultura de vigilância.

Os padrões moleculares analisados (PF 1 a PF 8) foram observados em 43 cepas do Berçário, além de três isolados com perfis diferentes destes. Na Figura 9 está a distribuição de todos os isolados e seus respectivos perfis durante o período do surto. As Figuras 10a e 10b apresentam a distribuição das cepas causadoras de infecções e colonizações, respectivamente, isoladas antes e após o início das culturas de vigilância.

Figura 8a - Representação gráfica da distribuição dos perfis moleculares observados no hospital, de 20-26 de Junho (semana 1) a 25-31 de dezembro (semana 28) de 2004.

Figura 8b – Representação gráfica da distribuição dos perfis moleculares observados no hospital, de 1-7 de janeiro (semana 29) a 24-30 de junho (semana 54) de 2005.

Figura 9 – Representação gráfica da distribuição dos perfis moleculares observados no Berçário do hospital, de 31/7-6/8 de 2004 (semana 7) a 5-11/2 de 2005 (semana 35).

Figura 10a – Representação gráfica da distribuição de cepas de ESBL-*Kp* isoladas em pacientes do Berçário no período do surto, provenientes de infecções, de 31/7-6/8 (semana 7) a 20-26/9 de 2004 (semana 23).

Figura 10b – Representação gráfica da distribuição de cepas de ESBL-*Kp* colonizadoras, isoladas em pacientes do Berçário no período do surto, provenientes de culturas de vigilância, de 20-26/11 (semana 20) a 12-18/12 (semana 35) de 2004.

Segundo Tenover *et al.*, 1995, perfis que diferem do perfil principal de um surto por 2 ou 3 fragmentos são considerados subtipos deste padrão, ou seja, fortemente relacionados ao surto.

Sendo assim, os perfis **PF 1** (16 bandas) e **PF 4** (17 bandas), **PF 3** (19) e **PF 5** (17), e **PF 7** (19) e **PF 8** (19), poderiam ser unidos e considerados como clones epidemiológicos. As Figuras 11, 12 e 13 apresentam a distribuição desses perfis somados e em separado no período estudado.

Figura 11 – Representação gráfica da distribuição dos perfis moleculares PF 1, PF 4 e PF 1-4 no hospital, de 20-26 de junho de 2004 (semana 1) a 5-11 de fevereiro de 2005 (semana 33).

Figura 12 – Representação gráfica da distribuição dos Perfis PF 3, PF 5 e PF 3-5 de cepas de *K. pneumoniae* no hospital, de 25-31 de dezembro (semana 28) a 12-18 de Fevereiro de 2005 (semana 34).

Figura 13– Representação gráfica da distribuição dos Perfis PF 7, PF 8 e PF 7-8 de cepas de *K. pneumoniae* no hospital, 20-26 de junho (semana 1) a 18-24 de dezembro (semana 25) de 2004.

6. DISCUSSÃO

O controle da resistência a antimicrobianos tem se tornado prioridade para hospitais e serviços relacionados à saúde no mundo todo. No Brasil, apesar dos dados escassos sobre o índice de infecção hospitalar e resistência de microrganismos, muitos projetos e pesquisas têm sido realizados numa tentativa de se conhecer o problema com base em dados consistentes para que as medidas mais adequadas de prevenção sejam adotadas (MENDES *et al.* 2000; ANVISA 2001; SADER *et al.* 2001; TOSIN *et al.* 2003).

A produção de β -lactamases é o mecanismo de resistência mais importante contra antimicrobianos β -lactâmicos em microrganismos Gram negativos. Entre estas enzimas, estão as β -lactamases de espectro estendido (ESBL), presentes principalmente em espécies da família *Enterobacteriaceae*, limitando as opções de tratamento para infecções hospitalares graves (HERNÁNDEZ *et al.* 2005; RAMPHAL & AMBROSE 2006).

De acordo com dados fornecidos pela CCIH do hospital deste estudo, as cepas de enterobactérias produtoras de ESBL representam um grande desafio ao controle das infecções e colonizações ocorridas na instituição, especialmente nas Unidades de Terapia Intensiva.

6.1 Espécies produtoras de ESBL

Na América Latina a prevalência de cepas do gênero *Klebsiella* produtoras de ESBL passou de 30% a 45% de 1997 a 2000. *Klebsiella pneumoniae* é a espécie em que mais se observa a produção de ESBL, e a localização plasmidial dos genes codificadores destas enzimas (genes *bla*) facilita sua transferência por conjugação

para muitas outras espécies de enterobactérias. No presente estudo, no período de um ano foi detectada a presença de 1 a 4 genes *bla* em cepas de 9 espécies: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* (LI *et al.* 2003; PFALLER & SEGRETI 2006).

6.2 Determinação dos Grupos de ESBL pela PCR

A maioria das ESBL pertencem aos grupos TEM e SHV, porém o surgimento de enzimas com baixa homologia com estes grupos e com perfis de resistência diversos tem sido objeto de estudo e um desafio para o tratamento de infecções causadas por cepas produtoras destas enzimas. A presença de vários genes em plasmídios de uma mesma cepa aumenta seu espectro de resistência e sua probabilidade de disseminação (CAO *et al.* 2002; PFALLER & SEGRETI 2006).

O presente trabalho pesquisou 8 grupos de ESBL em todas (135) as cepas de enterobactérias que apresentaram este fenótipo no período de um ano no hospital.

Os genes do grupo SHV foram detectados em 60% das cepas, em 6 espécies, sendo 87,7% *K. pneumoniae*. A maioria das enzimas deste grupo são ESBL, exceto SHV-1 e SHV-11, e segundo a literatura, a grande maioria das cepas de *K. pneumoniae* possuem o gene *bla*_{SHV-1} cromossômico. Sendo assim, a identificação de genes *bla*_{SHV} na maioria das cepas de *K. pneumoniae* neste estudo estaria de acordo com a literatura, porém apenas o seqüenciamento destes genes nos permitiria saber se são codificadores ou não de ESBL, principalmente em cepas que apresentaram mais de um dos genes *bla* (BABINI & LIVERMORE 2000; HOWARD *et al.* 2002).

As espécies *E. coli*, *E. cloacae*, *M. morganii*, *P. mirabilis* e o gênero *Providencia* já foram descritos como produtores do grupo SHV em outros estudos. (COUDRON *et al.* 1997; PITOUT *et al.* 1998; CHANAWONG *et al.* 2001; CAO *et al.* 2002; AIBINU *et al.* 2003; QUINTEROS *et al.* 2003; SANGUINETTI *et al.* 2003; KIM *et al.* 2004; HO *et al.* 2005; WU *et al.* 2005).

O grupo TEM foi identificado em 17% das cepas do estudo, em 5 espécies diferentes: *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. oxytoca* e *M. morganii*. No estudo de Cao *et al.* (2002), que também pesquisou diversos grupos de ESBL, este grupo foi identificado em *K. pneumoniae* (38%), *E. coli* (84%) e *P. mirabilis* (100%). No presente estudo apenas 4 cepas de *P. mirabilis* foram isoladas, e destas 2 possuíam os genes *bla*_{TEM}, muito comum nesta espécie. As espécies *M. morganii* e *K. oxytoca* já foram descritas como produtoras deste grupo de enzimas anteriormente (CAO *et al.* 2002; PAGANI *et al.* 2002; ARPIN *et al.* 2003; SANGUINETTI *et al.* 2003; KIM *et al.* 2004; BIENDO *et al.* 2005; ENDIMIANI 2005).

Assim como o grupo SHV, as enzimas TEM podem não ser de espectro estendido, como TEM-1 e TEM-2, e o seqüenciamento dos genes *bla*_{TEM} detectados neste estudo seria necessário para a identificação exata dos mesmos (BRADFORD 2001).

Genes do grupo CTX-M foram detectados em 32,6% dos isolados, em 7 espécies: *K. pneumoniae*, *E.coli*, *M. morganii*, *P. mirabilis*, *P. stuartii*, *K. oxytoca* e *E. aerogenes*, todas já descritas como produtoras de enzimas CTX-M. Este grupo é o mais comum entre as ESBL que não pertencem aos grupos TEM e SHV, sendo muito freqüente na América do Sul. Nos últimos 10 anos 50 enzimas diferentes foram descritas no mundo todo. No Brasil já foi caracterizada a ESBL CTX-M-8. Celenza

et al. (2006) detectou em seu estudo na Bolívia genes *bla*_{CTX-M} em 92% das cepas estudadas, em 6 espécies diferentes de enterobactérias. Quinteros *et al.* (2003) pesquisou na Argentina diversos grupos de ESBL em diferentes espécies de enterobactérias, e o grupo CTX-M foi detectado em maior quantidade de cepas (67%), e em maior variedade de espécies (7 de 8), assemelhando-se aos resultados deste trabalho (BONNET *et al.* 2000a; ALOBWEDE *et al.* 2003; BONNET 2004; RODRIGUEZ *et al.* 2005; RYOO *et al.* 2005; CELENZA *et al.* 2006; SOGE *et al.* 2006).

O grupo GES foi detectado em cepas de *P. mirabilis* e *K. pneumoniae*, em 4 pacientes de 3 setores e datas distintos (dados não apresentados). Os genes deste grupo de enzimas localizam-se em plasmídios e em integrons, nos quais podem estar presentes também genes *bla*_{VEB-1}, possuindo portanto um meio adicional de disseminação e resistência. Alguns estudos realizados na Ásia e na Europa têm sido divulgados com a pesquisa dos genes *bla*_{GES}, e na América do Sul há relatos da identificação dos mesmos apenas em *P. aeruginosa*, sendo este aparentemente o primeiro relato de cepas de enterobactérias produtoras do grupo GES de ESBL na América do Sul, a serem confirmadas pelo sequenciamento dos genes detectados (POIREL *et al.* 2000; CAO *et al.* 2002; CASTANHEIRA *et al.* 2004; KIM *et al.* 2004; KYOO *et al.* 2005; PASTERAN *et al.* 2005).

O grupo VEB foi identificado em 6 cepas, sendo 5 *K. pneumoniae* e 1 *P. mirabilis*. Este grupo de ESBL foi descoberto em cepas de *E. coli* na França, e já foi descrito em outras espécies de enterobactérias na Ásia e Europa. No estudo de Cao *et al.* (2002) no Vietnã (onde o gene foi descoberto) o gene *bla*_{VEB-1} foi detectado em 6 de 10 cepas de *P. mirabilis* e em *K. pneumoniae*, localizado em um integron onde

também foi identificado o gene *bla*_{OXA-10}. Na América Latina não há relatos sobre a produção deste grupo de β -lactamases, sendo o presente estudo aparentemente o primeiro relato de cepas de enterobactérias produtoras do grupo VEB de ESBL na América do Sul, a serem confirmadas pelo sequenciamento dos genes detectados (POIREL *et al.* 1999; CHANAWONG *et al.* 2001; WELDHAGEN *et al.* 2003; KIM *et al.* 2004; KYOO *et al.* 2005).

O gene *bla*_{PER-2} foi descoberto em cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium na Argentina, e permanece localizado exclusivamente na América do Sul. Neste estudo foi detectado em 8,1% das cepas, em 3 espécies distintas: *K. pneumoniae*, *P. stuartii* e *E. coli*. A presença deste grupo de ESBL nestas espécies e em outras enterobactérias, com exceção de *P. stuartii*, já foi descrita em outros estudos na Argentina e na Bolívia. Não foram observados relatos do gênero *Providencia* apresentando o gene *bla*_{PER-2} (BAUERFEIND *et al.* 1996; QUINTEROS *et al.* 2003; CELENZA *et al.* 2006).

O fato dos genes dos grupos OXA e PER-1 não terem sido detectados em nenhuma das cepas do estudo reafirma os relatos da literatura.

Os genes do grupo OXA, apesar de poder fazer parte do mesmo integron onde estão presentes genes para os grupos GES, VEB e PER-1, são descritos com mais frequência em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que em espécies da família *Enterobacteriaceae* (DANEL *et al.* 1995; CHANAWONG *et al.* 2001; PFALLER e SEGRETI 2006).

Já o gene *bla*_{PER-1} foi descoberto na Turquia em cepas de *P. aeruginosa*, e já foi descrito nesta espécie na França, Itália e Bélgica. Não há relatos da presença de enzimas ESBL PER-1 na América do Sul. Pagani *et al.* (2002) descreve um surto

causado por cepas de *P. mirabilis* produtoras da ESBL PER-1, na Itália, destacando sua provável capacidade de disseminação (DANEL *et al.* 1995; BAUERFEIND *et al.* 1996; PAGANI *et al.* 2002; WELDHAGEN *et al.* 2003).

As cepas em que nenhum dos genes pesquisados foi encontrado mesmo tendo o fenótipo ESBL podem conter genes de outros grupos não investigados neste trabalho, como em outros relatos, e serão avaliadas em estudos posteriores (CAO *et al.* 2002; HO *et al.* 2005).

O presente trabalho realizou a técnica de PCR e posterior visualização em gel de agarose para determinação de grupos de ESBL, uma vez que o objetivo era pesquisar a diversidade dos mesmos dentro do ambiente hospitalar. A identificação precisa dos genes poderá ser determinada por meio do seqüenciamento dos genes detectados em estudos posteriores.

6.3 Análise dos Perfis Moleculares de *Klebsiella pneumoniae*

A tipagem molecular contribui para a avaliação de surtos de infecção hospitalar, infecções recorrentes e disseminação clonal de patógenos específicos. A escolha da técnica de PFGE para a determinação dos perfis moleculares foi devido à sua alta capacidade discriminatória, boa reprodutibilidade e fácil interpretação. É considerada padrão-ouro para estudos de epidemiologia molecular, apesar de controvérsias quanto ao tempo e trabalho que exige. Tem sido adotada por programas de vigilância epidemiológica de patógenos multi-resistentes, inclusive o Programa Sentinela de Vigilância de Resistência Antimicrobiana no Brasil (TENOVER *et al.* 1995; MARTINS-LOUREIRO *et al.* 2001; TOSIN *et al.* 2003; CARTELLE *et al.* 2004).

A espécie produtora de ESBL com maior número de isolados no hospital no período estudado foi *K. pneumoniae* (71,9%), e por este motivo seu perfil molecular foi analisado.

Ao todo, foram identificados 8 perfis em 70,1% dos isolados, com similaridade mínima de 78%, além de 29 padrões não relacionados entre si (Figuras 5 e 6).

As infecções e colonizações por cepas dos perfis PF 1-4, PF 3-5 e PF 7-8 ocorreram, na maioria dos casos, no Berçário e Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (PF 5) e Pediátrica (PF1), e poucos perfis isolados foram identificados nestes setores. O sistema imunológico deficiente de pacientes nestas unidades e a excessiva manipulação e pressão de antimicrobianos que estes sofrem, podem ser fatores predisponentes para a ocorrência de infecções, bem como para a disseminação de genes de resistência (BRADFORD 2001; MARTINS-LOUREIRO *et al.* 2001; STÜRENBURG & MACK 2003; DAOUD & HAKIME 2003).

O perfil PF 6, apesar de ter sido isolado em 15 cepas, 8 destas eram provenientes de amostras de um único paciente, o qual esteve internado na UTI Neonatal, Berçário, UTI Pediátrica e Clínica Pediátrica durante todo o período deste trabalho (dados não apresentados), coincidindo com as datas de isolamento das cepas deste padrão molecular.

O perfil PF 2 foi identificado em três cepas isoladas de pacientes do Berçário e duas de pacientes da UTI Pediátrica, entre os meses de novembro e dezembro de 2004. Após este período, cepas pertencentes a este perfil molecular não foram mais isoladas em pacientes do hospital.

K. pneumoniae isoladas de pacientes da UTI Adulta, SEMI, Clínica Médica e Clínica Cirúrgica apresentaram apenas perfis não relacionados entre si. Segundo Tosin *et al.* (2003), quando os isolados são geneticamente distintos, o grupo de microrganismos resistentes pode ser formado devido à excessiva pressão seletiva de antimicrobianos, que favorece fenótipos resistentes dentro de um grupo de cepas não relacionadas, sendo um problema de resistência endêmica por diferentes grupos de organismos.

Li *et al.* (2003), após a tipagem molecular de 20 cepas de *K. pneumoniae*, detectaram 18 perfis distintos, sugerindo a transferência horizontal de genes de resistência como modo de disseminação. Estas cepas apresentavam genes do grupo CTX-M de ESBL, que é exclusivamente plasmidial.

No presente trabalho, as enzimas CTX-M foram identificadas em um grande número de cepas com perfis não relacionados (73,3%), e em poucos isolados dos demais perfis (dados não apresentados), o que pode sugerir que no ambiente deste estudo também houve disseminação de genes de resistência por conjugação. Outras observações nos resultados do presente estudo podem reafirmar este tipo de disseminação. Os grupos TEM e VEB de ESBL foram detectados em *K. pneumoniae* pertencentes ao perfil PF 4, porém não estavam presentes nas cepas PF 1, que foi agrupado ao PF 4 devido à sua alta similaridade. O mesmo ocorreu nos perfis PF 7 e PF 8, em que os grupos TEM e CTX-M estão presentes apenas no último, enquanto que o grupo VEB foi detectado apenas no primeiro.

Segundo Li *et al.* (2003), quando o mesmo clone apresenta diferentes genes *bla*, isto é devido à presença de diferentes plasmídios entre estes isolados. Tosin *et*

al. (2003) discute que o problema da transferência horizontal de genes de resistência poderia ser controlado pela restrição do uso de antimicrobianos.

Berçário

No estudo de Cartelle *et al.* (2004), a elevação do número de isolamentos de *K. pneumoniae* com baixa sensibilidade às cefalosporinas na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal os levou a suspeitar da ocorrência de um surto, que se confirmou após a tipagem molecular das cepas de 21 neonatos, provenientes de infecções e/ou colonizações. O surto foi controlado após a adoção de algumas medidas como isolamento dos pacientes infectados, uso de luvas e aventais descartáveis, e um maior cuidado na lavagem das mãos.

Esta situação se assemelha à do Berçário do hospital deste estudo, em que houve a suspeita da ocorrência de um surto pela CCIH, devido ao aparecimento de isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL em agosto de 2004. Cassetari *et al.* (2006) descrevem clinicamente este surto, e o presente trabalho procura esclarecer a forma de disseminação das cepas por meio da tipagem molecular das mesmas.

Considerou-se que o surto ocorreu em duas fases epidemiologicamente distintas. A primeira fase foi de agosto ao início de novembro de 2004, em que os casos ocorridos foram todos de infecções. Neste período, medidas de intervenção como precauções de contato e restrição do uso de cefalosporinas de terceira geração foram adotadas. Analisando o perfil molecular das cepas envolvidas neste período do surto, percebemos que em agosto observou-se os perfis PF 6 e PF 7-8, e a partir de setembro o perfil PF 1-4 começou a predominar entre os isolados (Figuras 10a, b).

As medidas adotadas pela CCIH não foram suficientes para que cessassem os

casos de isolamento de *K. pneumoniae* ESBL positiva no setor. Iniciou-se, então, a segunda fase do surto, em que culturas de vigilância semanais de *swab* retal de todos os pacientes foram realizadas. A partir de então, todos os casos ocorridos no setor até fevereiro de 2005 foram de colonização. A tipagem molecular das cepas por PFGE neste período (semanas 23 a 34) mostra que o perfil PF 1-4 foi predominante até a semana 27 (dezembro/2004), quando o perfil PF 3-5 passou a ser isolado com igual ou maior frequência que o PF 1-4 (Figura 10b). A seleção das cepas de um perfil que até então não havia sido isolado no hospital, e que só foi observado no berçário, pode ter ocorrido devido a alguma intervenção que estava em curso no período do surto, como mudanças nos esquemas de tratamento com antimicrobianos.

No início de 2005, foram realizadas culturas de *swabs* das mãos de todos os profissionais a serviço do berçário que apresentassem lesões dermatológicas de qualquer natureza. Em uma destas culturas foi identificada uma cepa de *K. pneumoniae* produtora de ESBL, a qual apresentou perfil molecular PF 1, identificado anteriormente no hospital em junho de 2004 (UTI Pediátrica), como colonizadora, e no berçário em setembro e outubro, em infecções. Em novembro, foi isolada em maior quantidade, durante as coletas de culturas de vigilância. Portanto, clones desta cepa (PF 1-4) já poderiam estar colonizando os pacientes do berçário antes mesmo de causar a primeira infecção, em setembro de 2004. O surto foi contido após a descolonização das mãos do servidor com ciprofloxacina oral e tópica, e o tratamento de uma onicomicose com fluconazol.

Uma vez que o paciente da UTI pediátrica portador do primeiro isolado da cepa em questão não esteve internado no berçário (dados não apresentados), é provável que a transmissão da mesma para outro setor tenha ocorrido pelo contato

com o ambiente hospitalar. O isolamento de cepas de outros perfis (PF 2, PF 6, PF 7 e perfis isolados) durante as culturas de vigilância no setor também podem indicar o mesmo tipo de transmissão. Percebe-se que, além da contenção do surto após o tratamento do servidor colonizado, as medidas de prevenção de contato e higiene foram também muito eficazes e contribuíram para que outros clones de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL fossem eliminados do ambiente.

O estudo realizado por Martins-Loureiro *et al.* (2001) relata resultados de tipagem molecular semelhantes em cepas de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes da UTI Neonatal de um hospital no Rio de Janeiro durante 2 anos. Os 42 isolados apresentaram 6 perfis distintos, sendo 4 identificados no primeiro ano do estudo e 2 no segundo. A intervenção com medidas de prevenção de contato controlou dois surtos que ocorreram em paralelo no primeiro ano, porém dois meses depois um novo clone passou a ser isolado no setor, provavelmente devido à pressão seletiva devido ao uso de cefalosporinas de terceira geração em um esquema de tratamento. Segundo os autores, a manipulação é a principal rota de transmissão de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL em UTI Neonatais, uma vez que o trato digestivo de recém nascidos é o principal reservatório destas bactérias. Pessoa-Silva *et al.* (2003) afirmam que apesar destes pacientes nascerem sem microflora gastrointestinal e a colonização ocorrer mais lentamente, *K. pneumoniae* ESBL positiva tem sido muito prevalente e a colonização por estas bactérias tem sido associada a infecções pelas mesmas. Cavassin (2003) também descreve um surto causado por cepas de *K. pneumoniae* em uma UTI Neonatal, o qual é controlado após medidas de prevenção de contato.

Um surto descrito por Pessoa-Silva *et al.* (2003) teve duração de 2 anos em uma UTI Neonatal. Após a realização do PFGE, 14 das 17 cepas isoladas de infecções tinham o mesmo perfil molecular, e as cepas isoladas de colonizações apresentaram 4 perfis distintos. Cepas isoladas de fômites e amostras de leite também foram avaliadas, porém a fonte de contaminação não foi identificada. Os autores concluem que a probabilidade era muito maior de que os procedimentos de rotina (manipulação) nos bebês tivessem transmitido o microrganismo, e que o longo período deste surto sugere que o ambiente tenha papel importante na persistência de *Klebsiella* spp no setor hospitalar.

Bagattini *et al.* (2006) investigaram a epidemiologia molecular de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL em uma UTI Neonatal. A investigação de focos e reservatórios ambientais de infecções foi incluída no estudo, e um único clone foi identificado em 3 pias, 2 superfícies em 3 quartos diferentes, 2 incubadoras, e da mão de um enfermeiro, sugerindo a transmissão horizontal deste clone de um paciente para outro por meio de um profissional do hospital.

Os resultados do presente trabalho sugerem que o problema da disseminação de clones e genes de resistência no ambiente hospitalar pode ocorrer devido ao contato com profissionais da saúde ou devido à transferência de pacientes entre setores, uma vez que cepas de perfis moleculares idênticos foram observadas em diferentes unidades, e isolados de pacientes apresentaram perfis idênticos à cepa proveniente das mãos de um servidor da instituição.

Os dados apresentados mostram a importância da conscientização quanto ao uso restrito de antimicrobianos β -lactâmicos, e das medidas de prevenção de contato, como lavagem correta e eficiente das mãos, utilização de luvas e aventais

descartáveis, isolamento de pacientes colonizados e/ou infectados por bactérias multi-resistentes, e monitoramento da transferência entre setores do hospital, e culturas de vigilância, as quais levaram a instituição em estudo a detectar a causa da disseminação de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL no Berçário.

7. CONCLUSÕES

- Há diversos genes *bla* disseminados no hospital estudado, inclusive alguns codificadores de grupos que ainda não haviam sido identificados no Brasil;
- Cepas com perfis moleculares distintos possuíam genes *bla* exclusivamente plasmidiais, sugerindo a transferência horizontal (conjugação) destes genes;
- Cepas com perfis similares foram disseminadas em algumas unidades, sugerindo contaminação no ambiente hospitalar.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Alobwede I, M'Zali FH, Livermore DM, Heritage J, Todd N, Hawkey PM. CTX-M extended-spectrum β -lactamase arrives in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 470-471.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [homepage na Internet]. [acesso em 2003 Out 9]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC-48, de 2 de junho de 2000. Aprova o Roteiro de Inspeção do Programa de Controle de Infecção Hospitalar [lei na Internet]. [acesso em 23 Out 2003]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/>
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Projeto Hospitais-Sentinela [documento na Internet]. Brasil; c2001. [acesso em 9 Out 2003]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/hsentinela/>
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Sistema Nacional de Informação para o Controle de Infecções em Serviços de Saúde (SINAIS) [homepage na Internet]. Brasil; c2001. [acesso em 10 Mar 2006]. Disponível em: www.anvisa.gov.br/servicosaude/
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Sistema Nacional de Informação para o Controle de Infecções em Serviços de Saúde (SINAIS) [homepage na Internet]. Brasil; c2002. [acesso em 10 Mar 2006]. Disponível em: www.anvisa.gov.br/divulga/
7. Aibinu IE, Ohaegbulam VC, Adenipekun EA, Ogunsola FT, Odugbemi TO, Mee BJ. Extended-spectrum β -lactamase enzymes in clinical isolates of *Enterobacter* species from Lagos, Nigeria. *J Clin Microbiol* 2003, 41:2197-2200.
8. Aitmhand R, Soukri A, Moustauoui N, Amarouch H, Eimdaghri N, Srot D, Benbachir M. Plasmid-mediated TEM-3 extended-spectrum β -lactamase production in *Salmonella typhimurium* in Casablanca. *J Antimicrob Chemother* 2002, 49:169-72.

-
9. Arpin C, Dubois V, Coulange L, André C, Fischer I, Noury P *et al.* Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3506-3514.
 10. Babini GS, Livermore DM. Are SHV β -lactamases Universal in *Klebsiella pneumoniae*?. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2230. Letter.
 11. Bagattini M, Crivaro V, Popolo A, Gentile F, Scarcella A, Triassi M *et al.* Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 979-982.
 12. Bauerfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E *et al.* Characterization of β -lactamase gene *bla*_{PER-2}, which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1996; 40: 616-620.
 13. Bermejo J, Lesnaberes P, Arnesi N, Gianello M, Notario R, Borda N *et al.* Factores de riesgo asociados a infecciones por *Klebsiella pneumoniae* resistentes a ceftacidima. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2003; 21:72-76.
 14. Biendo M, Thomas D, Laurans G, Hamdad-Daoudi F, Canarelli B, Rousseau F *et al.* Molecular diversity of *Proteus mirabilis* isolates producing extended-spectrum β -lactamases in a French university hospital. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 395-401.
 15. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1-14.
 16. Bonnet R, Sampaio JLM, Chanal C, Sirot D, Champs C de, Viallard JL *et al.* A novel class A extended-spectrum β -lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000a; 44:3061-68.
 17. Bonnet R, Sampaio JLM, Labia R, de Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot J. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000b; 44: 1936-1942.

18. Bouchillon SK, Johnson BM, Hoban DJ, Johnson JL, Dowzicky MJ, Wu DH *et al.* Determining incidence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24:119-24.
19. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:933-51. Review.
20. Brasil. Decreto Lei n.9431, de 6 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do país [lei da Internet]. [acesso em 23 Out 2003]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/leis/>
21. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1211-33.
22. Bush K, Jacoby GA. Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-spectrum and Inhibitor Resistant β -lactamases. Lahey Clinic [homepage na internet] c2003. [acesso em 3 Jul 2006]. Disponível em: <http://www.lahey.org/>
23. Cantón R, Oliver A, Coque TM, Varela MC, Pérez-Díaz JC, Baquero F. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1237-43.
24. Cao V, Lambert T, Nhu DQ, Loan HK, Hoang NK, Arlet G, Courvalin P. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:3739-43.
25. Cartelle M, Tomas MM, Pertega S, Beceiro A, Dominguez MA, Velasco D *et al.* Risk Factors for colonization and infection in a hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4242-4249.

-
26. Cassetari VC, Silveira IR, Balsamo AC, Franco F. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit linked to onychomycosis in a healthcare worker. J Pediatr (Rio J) 2006; 82.
 27. Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN. Emergence of the extended-spectrum β -lactamase GES-4 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 2344-45.
 28. Cavassin ED. Surto de infecção hospitalar causado por *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL em uma UTI-neonatal: análise e impacto das medidas de controle [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; 2003.
 29. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of *bla*_{CTX-M}-type and *bla*_{PER-2} β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. J Antimicrob Chemother 2006; 57: (975-978).
 30. Centers for Disease Control and Prevention. Preventing Emerging Infectious Diseases: a Strategy for the 21st Century [documento na internet]. Atlanta (GA); c1998. [acesso em 9 Out 2003]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/emergplan/>
 31. Chanawong A, M'zali FH, Heritage J, Lulitanond A, Hawkey PM. J Antimicrob Chemother 2001; 48: 839-852.
 32. Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. Int J Food Microbiol 2001; 68:11-20.
 33. Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:500-10.
 34. Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (CCIH-HU/USP). Manual para Prevenção das

- Infecções Hospitalares [manual na Internet]. São Paulo; c2003. [acesso em 22 Nov 2005]. Disponível em: <http://www.hu.usp.br/>
35. Corkill JE, Cuevas LE, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. SHV-27, a novel cefotaxime hydrolyzing β -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. J Antimicrob Chemother 2001, 47:463-65.
 36. Coudron PE, Moland ES, Sanders CC. Occurrence and detection of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a veterans medical center: seek and you may find. J Clin Microbiol 1997; 35: 2593-2597.
 37. Danel F, Hall LM, Gur D, Akalin HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1995; 35: 281-94.
 38. Daoud Z, Hakime N. Prevalence and susceptibility patterns of extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut, Lebanon. Rev Esp Quimioterap 2003; 16:233-38.
 39. Decré D, Burghoffer B, Gautier V, Petit JC, Arlet G. Outbreak of multi-resistant *Klebsiella oxytoca* involving strains with extended-spectrum β -lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal β -lactamase. J Antimicrob Chemother 2004, 54:881-88.
 40. Dhawan B, Bonnet R, Shukla NK, Mathur P, Das BK, Kapil A. Infection with an extended-spectrum β -lactamase-producing strain of *Serratia marcescens* following tongue reconstruction. J Clin Microbiol 2003, 41:2233-34.
 41. Dzidic S, Bedekovic V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. Acta Pharmacol Sin 2003; 24:519-26.
 42. Endimiani A, Luzzaro F, Brigante G, Perilli M, Lombardi G, Amicosante G et al. *Proteus mirabilis* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to the expression of extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2598-2605.
 43. Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. Clin Microbiol infect 2004; 10: 272-288.

-
44. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Task Force on Antimicrobial Resistance: Key Recommendations and Report [documento na internet]. Washington (DC); c2000. [acesso em 9 Out 2003]. Disponível em: <http://www.fda.gov/>
 45. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 10^a ed. St. Louis: Mosby; 1998. Cap. 17, p.234-49.
 46. Gales AC, Sader HS, Jones RN. Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44:289-99.
 47. Gniadkowski M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7:597-608.
 48. Gouby A, Neuwirth C, Bourg G, Bouziges N, Carles-Nurit MJ, Despaux E, Ramuz M. Epidemiological study by pulsed-field gel eletrophoresis of an outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Geriatric hospital. *J Clin Microbiol* 1994; 32:301-05.
 49. Gruteke P, Goessens W, Van Gils J, Peerbooms P, Lemmens-Den TN, Van Santen-Verheuvél M *et al.* Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum beta-lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1161-1166.
 50. Hernández JR, Pascual A, Cantón R, Martínez-Martínez L. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido em hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2003; 21:77-82.
 51. Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2122-2125.
 52. Ho PL, Ho AYM, Chow KH, Wong RCW, Duan RS, Ho WL *et al.* Occurrence and molecular analysis of extended-spectrum β -lactamase-

- producing *Proteus mirabilis* in Hong Kong, 1999-2002. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 840-845.
53. Ho PL, Shek RH, Chow KH, Duan RS, Mak GC, Lai EL *et al.* Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases among bloodstream isolates of *Enterobacter* spp in Hong Kong, 2000-2002. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 326-332.
54. Howard C, Daal A, Kelly G, Schooneveldt J, Nimmo G, Giffard PM. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β -lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 659-664.
55. Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde [homepage na Internet]. [acesso em 6 Out 2003]. Disponível em: <http://www.ccih.med.br/>
56. Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde, Núcleo de Apoio ao Controle de Infecção Hospitalar. Programa de Qualidade Hospitalar [documento na Internet]. São Paulo; c1998. [acesso em 23 Out 2003]. Disponível em: <http://www.ccih.med.br/nacih.html/>
57. Jacoby GA, Mills DM, Chow N. Role of β -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:3203-06.
58. Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988; 10:867-78.
59. Kim JY, Park YJ, Kim SI, Kang MW, Lee SO, Lee KY. Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in a Korean university hospital. J Antimicrob Chemother 2004a, 54:1144-47.
60. Kim S, Kim J, Kang Y, Park Y, Lee B. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases in members of the genus *Shigella* in the republic of Korea. J Clin Microbiol 2004b, 42:5264-69.

-
61. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:302-07.
 62. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido. 5^a ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001. Provas de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos; p.795-865.
 63. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman N. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1162-71.
 64. Lewin B. Genes V. 4^a ed. Nova Iorque (NY): Oxford University Press; 1995a. Phage Strategies: lytic cascades and lysogenic repression; p.493.
 65. Lewin B. Genes V. 4^a ed. Nova Iorque (NY): Oxford University Press; 1995b. The replicon: unit of replication; p.549-553.
 66. Lewin B. Genes V. 4^a ed. Nova Iorque (NY): Oxford University Press; 1995c. Transposons that mobilize via DNA; p.999-1031.
 67. Li CR, Li Y, Zhang PA. Dissemination and spread of CTX-M extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in central China. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22: 521-525.
 68. Lin MF, Huang ML, Lai SH. Risk factors in the acquisition of extended-spectrum β -lactamase *Klebsiella pneumoniae*: a case-control study in a district teaching hospital in Taiwan. *J Hosp Infect* 2003, 53:39-45.
 69. Lincopan N, McCulloch JÁ, Reinert C, Cassetari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First Isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 516-519.
 70. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998, 351:797-99.
 71. Martínez-Martínez L, Pascual A, Conejo MC, García I, Joyanes P, Doménech-Sanchez A, Benedí VJ. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*

- and relationship to extended-spectrum β -lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 39:26-32.
72. Martins-Loureiro M, Moraes BA, Mendonça VL, Rocha-Quadra MR, Santos-Pinheiro G, Dutra-Asensi M. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonatal intensive care unit patients involved in hospital infection cases in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Latinoam Microbiol* 2001; 43(2): 88-95.
73. Matté GR. Estudo de *Vibrio* spp potencialmente patogênicos através de métodos moleculares [tese de livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2003.
74. Matté MH. Ribotipagem de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria* e *Aeromonas jandaei*, potencialmente patogênicas, isoladas de amostras de água do reservatório de Guarapiranga, São Paulo [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 1996.
75. Mendes C, Hsiung A, Kiffer C, Oplustil C, Sinto S, Mimica I, Zoccoli C, Mystic Study Group. Evaluation of the *in vitro* activity of 9 antimicrobials against bacterial strains isolated from patients in intensive care units in Brazil: MYSTIC Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis* 2000; 4(5): 236-244.
76. Mendes C, Kiffer C, Segura A, Ribeiro J, Turner P. *Klebsiella pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. *Braz J Infect Dis* 2004, 8:109-11.
77. Ministério da Saúde [homepage na Internet]. [acesso em 23 Out 2003]. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/>
78. Ministério da Saúde. Portaria MS 2616, de 12.5.1998: expede diretrizes e normas para a prevenção e o controle das infecções hospitalares [lei na Internet]. [acesso em 30 Out 2003]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/index98/>
79. Motta RN, Oliveira MM, Magalhães PSF, Dias AM, Aragão LP, Forti AC, Carvalho CBM. Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase-producing strains of *Enterobacteriaceae* isolated from diabetes foot infections in a Brazilian diabetic center. *Braz J Infect Dis* 2003, 7:129-34.

-
80. Mulvey MR, Soule G, Boyd D, Demczuk W, Ahmed R *et al.* Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. J Clin Microbiol 2003, 41:460-62.
 81. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003a. Disk Difusion Supplemental Tables. Informational Supplement M100-S13 (M2). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne (Pa).
 82. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003b. MIC Testing Supplemental Tables. Informational Supplement M100-S13 (M7). National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne (Pa).
 83. Naumiuk L, Baraniak A, Gnisdkowski M, Krawczyk B, Rybak B, Sadowy E *et al.* Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* in two hospitals in Danzig, Poland, over a 5-year period. J Clin Microbiol 2004, 42:3108-16.
 84. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect 2002, 8:321-31.
 85. Organização Mundial da Saúde [homepage na Internet]. [acesso em 9 Maio 2006]. Disponível em: www.who.int/
 86. Organização Panamericana da Saúde [homepage na Internet]. [acesso em 9 maio 2006]. Disponível em: www.opas.org.br/.
 87. Oteo J, Campos J, Baquero F. Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European antimicrobial resistance surveillance system (2001). J Antimicrob Chemother 2002, 50:945-52.
 88. Pagani L, Migliavacca R, Pallecchi L, Matti C, Giacobone E, Amicosante G *et al.* Emerging extended-spectrum β -lactamases in *Proteus mirabilis*. J Clin Microbiol 2002, 40:1549-52.
 89. Pasteran F, Faccone D, Petroni A, Rapoport M, Galas M, Vazquez M, Procopio A. Novel variant *bla*_{VIM-11} of the metallo-beta-lactamase *bla*_{VIM} family in a GES-1 extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 474-475.
 90. Paterson DL, Mulazimoglu L, Casellas JM, Ko W, Goossens H, Gottberg AV *et al.* Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to

- extended-spectrum β -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. Clin Infect Dis 2000; 30:473-78.
91. Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J *et al.* Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:53-58.
92. Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J *et al.* An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia, including strains producing extended-spectrum β -lactamase. J Hosp Infect 2001; 47:53-59.
93. Pessoa-Silva CL, Moreira BM, Almeida VC, Flannery B, Lins MCA, Sampaio JLM *et al.* Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: risk factors for infection and colonization. J Hosp Infect 2003; 53:198-206.
94. Pfaller MA, Segreti J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum β -lactamases. Clin Infect Dis 2006; 42:S153-63.
95. Pitout JD, Thomson KS, Hanson ND, Ehrhardt AF, Moland ES, Sanders CC. Beta-lactamases responsible for resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1350-1354.
96. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. J Antimicrob Chemother 2005; 56: 52-59.
97. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 573-581.
98. Poirel L, Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the

- class 1 integron IN52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 622-632.
99. Quale JM, Landman D, Bradford P, Visalli M, Ravishankar J, Flores C *et al*. Molecular epidemiology of a citywide outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection. Clin Infect Dis 2002; 35:834-41.
100. Quinteros M, Radice M, Gardella N, Rodriguez MM, Costa N, Korbenfeld D *et al*. Extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2864-2867.
101. Rodriguez C, Radice M, Perazzi B, Castro S, Juárez J, Santini P *et al*. Resistencia enzimática a betalactámicos en el género *Proteus* y evaluación de los fenotipos y genotipos de resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en *Proteus mirabilis*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23: 122-126.
102. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Martínez-Martínez L, Muniain MA, Perea EJ *et al*. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. J Clin Microbiol 2004; 42:1089-94.
103. Rollins School of Public Health of Emory University. Project ICARE (Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology) Phase 1, 2, 3 and 4 [documento na internet]. Atlanta (GA); c1995. [acesso em 9 Out 2003]. Disponível em: <http://www.sph.emory.edu/ICARE/>
104. Ryoo NH, Kim EC, Hong SG, Park YJ, Lee K, Bae IK *et al*. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. J Antimicrob Chemother 2005; 56:698-702.
105. Sabaté M, Miró E, Navarro F, Vergés C, Aliaga R, Mirelis B, Prats G. β -Lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). J Antimicrob Chemother 2002; 49:989-97.

-
106. Sader HS. Antimicrobial Resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. *Braz J Infect Dis* 2000; 4(2): 91-99.
107. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Braz J Infect Dis* 2001, 5:200-214.
108. Sader HS, Jones RN, Andrade-Baiocchi S, Biedenbach DJ *et al.* Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 44:273-80.
109. Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent developments in β -lactamases and extended-spectrum β -lactamases. *BMJ* 2003; 327:1209-13. Review.
110. Sanguinetti M, Posteraro B, Spanu T, Ciccaglione D, Romano L, Fiori B *et al.* Characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix Extended-Spectrum β -Lactamase detection method. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1463-1468.
111. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Res Microbiol* 2004, 155:409-21.
112. Shlaes DM, Gerding DN, John JF, Craig Jr WA, Bornstein DL, Duncan RA *et al.* Society for Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance: Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Clin Infect Dis* 1997; 25:584-99.
113. Sirot J, Nicolas-Chanoine MH, Chardon H, Avril JL, Cattoen C, Croix JC *et al.* Susceptibility of *Enterobacteriaceae* to β -lactam agents and fluoroquinolones: a 3-year survey in France. *Clin Microbiol Infect* 2002, 8:207-13.
114. Snyder L, Champness W. *Molecular Genetics of Bacteria*. 2^a ed. Washington (DC): ASM Press; 1997a. Transformation; p. 149-159.
115. Snyder L, Champness W. *Molecular Genetics of Bacteria*. 2^a ed. Washington (DC): ASM Press; 1997b. Bacteriophages; p. 178-180.

-
116. Soge OO, Queenan AM, Ojo KK, Adeniyi BA, Roberts MC. CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase from Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2006; 57: (24-30).
 117. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect 2003; 47:273-95. Review.
 118. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel eletrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233-2239. Guest Comentary.
 119. Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver A *et al*. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum β -actamase confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during project ICARE. J Clin Microbiol 2003; 41:3142-46.
 120. Tolun V, Küçükbasmac Ö, Törümküney-Akbulut D, Çatal Ç, Ang-Küçüker M, Ang Ö. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum β -lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. Clin Microbiol Infect 2004, 10:72-75.
 121. Tosin I, Silbert S, Sader HS. The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among Gram-negative rods in Brazilian Hospitals. Braz J Infect Dis 2003, 7:360-69.
 122. Tumbarello M, Citton R, Spanu T, Sanguinetti M, Romano L, Fadda G, Cauda R. ESBL-producing multidrug-resistant *Providencia stuartii* infections in a university hospital. J Antimicrob Chemother 2004, 53:277-82.
 123. Valverde A, Coque TM, Sánchez-Moreno MP, Rollán A, Baquero F, Cantón R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. J Clin Microbiol 2004, 47:69-75.
 124. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2385-2392.

-
125. Wu LT, Tsou MF, Wu HJ, Chen HE, Chuang YC, Yu WL. Survey of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) among cefotaxime-resistant *Serratia marcescens* at a medical center in middle Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004, 49:125-29.
 126. Wu LT, Wu HJ, Chung JG, Chuang YC, Cheng KC, Yu WL. Dissemination of *Proteus mirabilis* isolates harboring CTX-M-14 and CTX-M-3 β -lactamase at 2 hospitals in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 59: 89-94.
 127. Xiong Z, Zhu D, Wang F, Zhang Y, Okamoto R, Inoue M. Investigation of extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from China. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44:195-200.
 128. Yong D, Park R, Yum JH, Lee K, Choi EC, Chong Y. Further modification of the Hodge test to screen AmpC β -lactamase (CMY-1)-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Microbiol Methods* 2002, 51:407-10.
 129. Yu WL, Jones RN, Hollis RJ, Messer SA, Biedenbach DJ, Deshpande LM, Pfaller MA. Molecular Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing, fluoroquinolone-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2002, 40:4666-69.
 130. Yu WL, Wu LT, Pfaller MA, Winokur PL, Jones RN. Confirmation of extended-spectrum β -lactamase-producing *Serratia marcescens*: preliminary report from Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003, 45:221-24.
 131. Yuan M, Aucken H, Hall LMC, Pitt TL, Livermore DM. Epidemiological typing of klebsiellae with extended-spectrum β -lactamases from European intensive care units. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41:527-39.